

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Vanessa Webber

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARRAGENANA
OBTIDA DE *Kappaphycus alvarezii***

Florianópolis

2010

Vanessa Webber

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARRAGENANA
OBTIDA DE *Kappaphycus alvarezii***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto

Florianópolis

2010

Catálogo na fonte pela biblioteca da
Universidade Federal de Santa Catarina

W372e Webber, Vanessa

Extração e caracterização de carragenana obtida de *Kappaphycus alvarezii* [dissertação] / Vanessa Webber ; orientador, Pedro Luiz Manique Barreto. - Florianópolis, SC, 2010.

135 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Carragenana. 3. Extração. 4. Alga. 5. *Kappaphycus alvarezii*. I. Barreto, Pedro Luiz Manique. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

CDU 663/664

Vanessa Webber

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CARRAGENANA
OBTIDA DE *Kappaphycus alvarezii***

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciência dos Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 27 de julho de 2010.

Prof^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Leila Hayashi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Vildes M. Scussel, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Edna Regina Amante, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico a meus pais Ivete e Valter Webber, os maiores incentivadores na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar guiando e iluminando o meu caminho.

A minha família, por todo apoio, incentivo e por acreditarem em mim.

Ao Maurício, pelo amor, paciência, compreensão e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto pela orientação, dedicação, amizade.

À Prof^ª. Dra. Edna Regina Amante e a todos do Laboratório de Frutas e Hortaliças pela disposição em ajudar.

À Dra. Leila Hayashi e sua equipe, pela colaboração no trabalho e pela doação das algas.

À colega Sabrina Matos de Carvalho pelas discussões durante o andamento do trabalho e pela amizade.

Às amigas Daniela Mezalira e Renata Mello pelo companheirismo e pelos ensinamentos sobre química.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

A coisa mais perfeita que podemos experimentar é o misterioso. É a fonte de toda a arte e de toda ciência verdadeira.

Albert Einstein

RESUMO

O efeito de uma nova metodologia de extração de carragenana da alga *Kappaphycus alvarezii* sobre as suas propriedades químicas, físicas e reológicas foi avaliado. A metodologia de extração da carragenana nativa utilizada foi baseada em banhos com água a temperatura elevada, filtração e secagem em *spray-dryer*. A Metodologia de superfície de resposta foi empregada para avaliar a influência da temperatura e do tempo de extração no rendimento de carragenana e nas propriedades de força do gel e viscosidade. Na condição satisfatória de 74 °C e 4 h a extração da carragenana apresentou bom rendimento, melhores propriedades de gelificação e viscosidade alta. Os modelos desenvolvidos e analisados estatisticamente demonstraram que são adequados para a otimização do processo de extração de carragenana de *K. alvarezii* pelo procedimento realizado. A quantificação de carboidratos, grupos éster-sulfato e de minerais foi realizada para avaliar a composição química da carragenana nativa, a qual se mostrou semelhante à carragenana comercial de alta qualidade analisada. A estrutura química da carragenana nativa foi avaliada por espectroscopia FTIR e por ¹H-RMN e os resultados comprovaram a presença predominante de κ-carragenana e, portanto, sua semelhança com a carragenana comercial. A transição gel-sol foi avaliada por DSC, SAXS e DMTA. Os resultados foram congruentes, apresentando uma mesma faixa de temperatura de transição em aproximadamente 50 °C para a amostra nativa e a comercial. O índice de polidispersidade encontrado por CPG para a carragenana nativa indica a presença de cadeias com diferentes massas molares, porém, o valor obtido foi comparável ao encontrado na literatura. A carragenana nativa obtida mostrou-se segura do ponto de vista da massa molar. As propriedades reológicas avaliadas pelas análises de viscosidade e pelo teste de relaxação comprovaram a similaridade da amostra nativa com a comercial, sendo que ambas apresentaram comportamento Newtoniano (1,5 % m/m e 75 °C) e foram consideradas sólidos viscoelásticos (3 % m/m e 8 °C). Em geral, as propriedades da carragenana nativa se mostraram comparáveis às propriedades mostradas por carragenanas extraídas por outros métodos citados na literatura, o que indica o alto potencial desta metodologia limpa na extração deste ficocolóide. Portanto, estes resultados demonstram o sucesso da extração de carragenana nativa de *K. alvarezii*, fornecendo benefícios potenciais para extração industrial, tanto do ponto de vista econômico como ambiental.

Palavras-chave: carragenana, extração, alga, *Kappaphycus alvarezii*.

ABSTRACT

The effect of a new methodology for extraction of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* on their chemical, physical and rheological properties was evaluated. The native carrageenan extraction methodology was based on baths with water at high temperature, filtration and drying spray-dryer. The response surface methodology was used to evaluate the influence of time and extraction temperature on yield and properties of carrageenan as gel strength and viscosity. In satisfactory condition of 74 °C and extraction of carrageenan for 4 h showed good performance, better properties of gelation and high viscosity. The models developed and analyzed statistically showed that are suitable for the optimization of the extraction of *K. alvarezii* carrageenan by procedure performed. Quantification of carbohydrates, ester sulfate and minerals were performed to evaluate the chemical composition of native carrageenan, which was similar to the high quality commercial carrageenan. The chemical structure of native carrageenan was evaluated by FTIR and ¹H-NMR. The results confirmed the predominant presence of κ-carrageenan, and therefore its similarity to commercial carrageenan. The gel-sol transition was evaluated by DSC, SAXS and DMTA. The results were congruent, showing the same range of transition temperature at about 50°C for native and commercial sample. The polydispersity index by GPC found for native carrageenan indicates the presence of chains with different molecular weights, but the value was comparable to that found in the literature. The native carrageenan obtained proved to be safe from the viewpoint of the molar mass. The rheological properties evaluated by the analysis of viscosity and relaxation test confirmed the similarity with the native trade. Both of them showed Newtonian behavior (1.5 % w/w 75 °C) and were considered viscoelastic solids (3 % w/w 8 °C). In general, the properties of native carrageenan proved comparable properties shown by carrageenan extracted by other methods in literature. That indicates the high potential of this clean method in the extraction of phycocolloids. These results demonstrate the native carrageenan *K. alvarezii* successful extraction, providing potential benefits to industrial logging, both, economically and environmentally wise.

Keywords: carrageenan, extraction, seaweed, *Kappaphycus alvarezii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular dos monômeros da carragenana e conversões decorrentes dos tratamentos alcalino e/ou enzimático.....	33
Figura 2 - Estrutura Curva típica de relaxação de materiais viscoelásticos.....	47
Figura 3 - Curva característica da análise de textura. O pico positivo é a força do gel, a área positiva (A1) é a consistência, a área negativa (A2) é a adesividade e, o pico negativo é a força máxima de adesão.....	48
Figura 4 - Rendimento da extração em carragenana de <i>K. alvarezii</i> (a) Valores preditos pelos observados (b) Resíduos pelos valores preditos.....	74
Figura 5 - Força do gel da carragenana de <i>K. alvarezii</i> (a) Valores preditos pelos observados (b) Resíduos pelos valores preditos.....	75
Figura 6 - Viscosidade da carragenana de <i>K. alvarezii</i> . (a) Valores preditos pelos observados (b) Resíduos pelos valores preditos.....	76
Figura 7 - Superfície de Resposta mostrando o efeito da temperatura e tempo de extração sobre o rendimento na extração de carragenana de <i>K. alvarezii</i>	78
Figura 8 - Superfície de Resposta mostrando o efeito da temperatura e tempo de extração sobre a força do gel de carragenana de <i>K. alvarezii</i>	79
Figura 9 - Superfície de Resposta mostrando o efeito da temperatura e tempo de extração sobre a viscosidade da solução de carragenana de <i>K. alvarezii</i> (1,5 % p/p) a 75 °C.....	80
Figura 10 - Espectro FTIR das amostras padrão de carragenana κ (a), ι (b), λ (c) e das amostras comercial (d) e nativa (e).....	90
Figura 11 - Espectros de ^1H RMN para as carragenanas κ (a), ι (b), λ (c), comercial (d) e nativa (e).....	94
Figura 12 - Espalhamento de raios-X a baixos ângulos para a carragenana nativa a diferentes temperaturas.....	95
Figura 13 - Raios de giração obtidos nas diversas temperaturas estimados através das análises de espalhamento de raios-X a baixos ângulos para a carragenana nativa.....	97
Figura 14 - Curva de fluxo das carragenanas: ▲ comercial e ● nativa.....	100
Figura 15 - Curvas de relaxação das carragenanas: ● comercial (3 % m/m) e ● nativa (3% m/m).....	102
Figura 16 - Termograma calorimétrico de aquecimento de solução aquosa de carragenana 1,5 % (a) κ , (b) ι , (c) comercial e (d) nativa. Taxa de aquecimento 5 °C/min.....	106

Figura 17 - Comportamento térmico dinâmico-mecânico com as curvas E' e E'' em temperaturas variando de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a) carragenana comercial, (b) carragenana nativa – (■ E' e ● E'')	108
Figura 18 - Comportamento térmico dinâmico-mecânico com as curvas E' e $\tan\delta$ em temperaturas variando de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a) carragenana comercial, (b) carragenana nativa	110
Figura 19 - Varredura de frequência comparando a amostra comercial com a amostra nativa de carragenana a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Quadrados, E' ; Círculos, E'' ; símbolo aberto, comercial; símbolo fechado nativa.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis codificados das duas variáveis empregadas para extração de carragenana no planejamento composto central.....	60
Tabela 2 - Resultados do rendimento, da força do gel e da viscosidade da carragenana de <i>Kappaphycus alvarezii</i> baseados no tempo e na temperatura de extração	71
Tabela 3 - Coeficientes de regressão, erro padrão e valores p para o modelo de extração natural da carragenana de <i>K. alvarezii</i>	73
Tabela 4 - Modelo de superfície de resposta para carragenana extraída de <i>K. alvarezii</i>	73
Tabela 5 - Análise de variância para o modelo de superfície de resposta do rendimento da extração, força do gel e viscosidade da carragenana extraída de <i>K. alvarezii</i>	77
Tabela 6 - Composição química das carragenanas comercial e nativa..	82
Tabela 7 - Identificação dos tipos de carragenana por espectroscopia no infravermelho	85
Tabela 8 - Massa molecular média, massa molecular numérica, massa molecular média ponderal, o índice de polidispersidade e o raio hidrodinâmico da carragenana nativa.....	98
Tabela 9 - Relação entre o fator-p e a morfologia das partículas	99
Tabela 10 - Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros reológicos de relaxação das carragenanas nativa e comercial. Grau de solidez, taxa inicial de decaimento da força, força máxima aplicada em $t=0$ (F_0) e razão de relaxação	103
Tabela 11 - Temperaturas de transição gel-sol de géis (1,5 % m/m) de carragenanas κ , ι , comercial e extraída na condição otimizada, de acordo com os resultados obtidos em DSC.....	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

κ – kappa

ι – iota

λ – lambda

μ – mu

ν – nu

G4S – α -D-galactose-4-sulfato

DA2S – 3,6-anidrogactose-2-sulfato

DA – anidrogactose

G2S – α -D-galactose-2-sulfato

D2S,6S – β -D-galactose-2,6-sulfato

β – beta

ξ – xi

θ – theta

RMN – ressonância magnética nuclear

IR – infravermelho

FTIR – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

pH – potencial hidrogeniônico

HPSEC-RI – cromatografia de exclusão molecular de alta eficiência

acoplada a um detector de índice de refração

SAXS – espalhamento de raios-X a baixos ângulos

DSC – calorimetria exploratória diferencial

G' – módulo elástico para fluidos

G'' – módulo viscoso para fluidos

FTIR-ATR – espectroscopia no infravermelho com transformada de

Fourier de refletância total atenuada

FTIR-PLS – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier com regressão multivariada (*partial least square*)

I – intensidade de luz

R_g – raio de giração

η – viscosidade intrínseca

CPG – cromatografia de permeação em gel

M_n – massa molar numérica média

M_w – massa molar ponderal média

IP – índice de polidispersão

ΔT – diferença de temperatura

$\Delta \phi$ – diferença de fluxo de calor

DMTA – análise térmica dinâmico-mecânica

E' – módulo elástico para sólidos

E'' – módulo viscoso para sólidos

$\tan \delta$ – amortecimento ou atrito interno

RSM – metodologia de superfície de resposta

CCD – delineamento central composto

MLR – regressão linear múltipla

ANOVA – análise de variância

R_{RELAX} – razão de relaxação

F – força

R_h – raio hidrodinâmico

M_z – massa molar média

T_{g-s} – temperatura de transição sol-gel ou temperatura de fusão do gel

SEC-MALLS – cromatografia de exclusão molecular acoplada ao espalhamento de luz a laser em múltiplos ângulos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Doty) Doty ex. Silva.....	29
2.2 CARRAGENANA	31
2.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS.....	32
2.4.1 Gelificação	41
2.4.2 Propriedades reológicas.....	45
2.4.2.1 Viscoelasticidade	46
2.4.2.2 Análise de textura instrumental.....	48
2.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	49
2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	50
2.6.1 Espectroscopia no infravermelho	50
2.6.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	51
2.6.3 Espalhamento de raios X a baixos ângulos	52
2.6.4 Cromatografia de permeação em gel.....	55
2.6.5 Calorimetria exploratória diferencial	55
2.6.6 Análise térmica dinâmico-mecânica	56
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.1 AMOSTRAS	59
3.2 EXTRAÇÃO AQUOSA DE CARRAGENANA.....	59
3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	60
3.3.1 Análises estatísticas.....	60
3.4.1 Viscosidade	61
3.4.2 Análise instrumental de textura.....	62
3.5 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARRAGENANA COMERCIAL E NATIVA.....	62
3.5.1 Determinação de sulfato.....	62
3.5.2 Determinação de carboidratos totais	63
3.5.3 Determinação de minerais	64
3.5.3.1 Determinação de fosfato	64
3.5.3.2 Determinação de cálcio.....	65
3.5.3.3 Determinação de ferro.....	65
3.5.3.4 Determinação de sódio e potássio	65
3.5.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier	65
3.5.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	66
3.5.6 Espalhamento de raios X a baixos ângulos	66
3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO GEL E DA CARRAGENANA EM SOLUÇÃO	66

3.6.1	Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel	66
3.6.2	Teste de relaxação	67
3.6.3	Calorimetria exploratória diferencial	68
3.6.4	Análise térmica dinâmico mecânica.....	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA CARRAGENANA.....	71
4.1.1	Análise de variância	77
4.2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	82
4.3	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	83
4.4	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	91
4.5	ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS.	95
4.6	CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL	97
4.7	VISCOSIDADE.....	100
4.8	TESTE DE RELAXAÇÃO.....	101
4.9	CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL... ..	103
4.10	ANÁLISE TÉRMICA DINÂMICO- MECÂNICA	107
5	CONCLUSÃO.....	113
6	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

Durante séculos, algas vermelhas (*Rhodophyta*) foram usadas em alimentos no extremo oriente e na Europa (IMESON, 2000). Porém, somente a partir dos anos 80 organismos marinhos tais como bactérias, micro e macro algas vêm sendo gradativamente reconhecidos por representar uma extensa fonte inexplorada de materiais valiosos. São encontrados vários resíduos de carboidratos raros em microrganismos marinhos, os quais são especialmente interessantes e, por isso, é preciso enfatizar a obtenção de maior conhecimento nesta área (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Diferentes espécies de *Rhodophyceae* contêm polissacarídeos naturais que preenchem os vazios dentro da estrutura de celulose da planta. Dentre estes polissacarídeos se encontra a carragenana (IMESON, 2000). Este polímero sulfatado tem, provavelmente, muitas funções biológicas na alga: como uma barreira na troca de cátions, reservatório de água do mar (na matriz do gel) – reduzindo os riscos de estresse osmótico e perda de cátions – e, também, como uma espécie de amortecedor para proteger as células da força das ondas (BODEAU-BELLION, 1983).

Carragenanas são tradicionalmente usadas como agente gelificante, emulsificante e estabilizante em produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos. A indústria de alimentos, em particular, é responsável pelo uso de 70-80 % da produção mundial de carragenana, estimada em aproximadamente 45000 toneladas por ano, da qual aproximadamente 45 % se destinam a produtos lácteos e 30 % para carnes e derivados (TARLO; DOLOVICH; LISRGARTEN, 1995; IMESON, 2000; PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003).

Embora esteja presente na maioria das aplicações somente em concentrações menores de 1 %, a carragenana pode ter significativa influência sobre a textura e propriedades sensoriais dos produtos alimentícios (TARLO; DOLOVICH; LISRGARTEN, 1995; IMESON, 2000). A produção da indústria de carragenana excedeu 50 mil toneladas entre 2007 e 2008, com um valor superior a US\$ 600 milhões (excluindo a produção da China) (GUIRY, 2009).

Carragenana é um nome genérico dado para família de galactanas naturais isoladas de algas vermelhas de algumas famílias como *Gigartinaceae*, *Solieriaceae*, *Hypneaceae*, *Phyllophoraceae* (LARA, 1991). Os diferentes tipos de carragenana podem ser distinguidos por suas estruturas primárias. Elas são distribuídas em três formas

principais, denominadas κ -carragenana (kappa), ι -carragenana (iota) e λ -carragenana (lambda), as quais são classificadas de acordo com a presença de ligações 3,6-anidro ligadas ao resíduo de galactose e com a posição e o número de grupos sulfato (MEUNIER; NICOLAI; DURAND, 1999; PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; HILLIOU et al., 2006; VAN DE VELDE, 2008;). Outros dois tipos, carragenanas μ (mu) e ν (nu), as quais são precursores biológicos de κ - e ι - carragenana, respectivamente, são freqüentemente encontradas em carragenanas comerciais. Estas carragenanas precursoras são resultado do rearranjo interno pelo tratamento alcalino ou, *in vivo*, pela ação de sulfohidrolases (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; HILLIOU et al., 2006; VAN DE VELDE, 2008).

O arranjo das estruturas dos dissacarídeos (monômeros) e suas respectivas quantidades na macromolécula de carragenana são específicos para cada tipo de alga que a produz, e dependem do ciclo biológico da alga (LAHAYE, 2001; HILLIOU et al., 2006). A presença de quantidades consideráveis de unidades de precursores em preparações de carragenana comercial tem forte efeito negativo sob as propriedades funcionais (gelificantes). Portanto, a hidrólise alcalina induzida através do pré-tratamento é utilizada para remover grupos sulfato e, conseqüentemente, aumentar a habilidade da carragenana formar gel (VAN DE VELDE et al., 2002). Entretanto, em nível industrial, este pré-tratamento alcalino deve ser cuidadosamente controlado a fim de evitar a considerável poluição gerada pelo descarte de resíduos alcalinos e outros compostos orgânicos gerados pelo mesmo que possam vir a prejudicar o meio ambiente.

Kappaphycus alvarezii, conhecida popularmente como *Eucheuma cottoni* (ou simplesmente *cottoni*), é uma alga de ótimo valor comercial, cultivada principalmente no extremo oriente como matéria-prima para a produção de κ -carragenana (ESTEVEZ; CIANCIA; CERESO, 2004). Estudos recentes dos produtos extraídos de *Kappaphycus alvarezii* com água à temperatura ambiente mostraram que consistem em carragenanas de alta massa molecular com dispersão estrutural em torno de um padrão básico κ (74 % - 93 %) (ESTEVEZ; CIANCIA; CERESO, 2000; 2004; VAN DE VELDE et al., 2005). A produção de κ -carragenana no Brasil ainda é pequena e restrita a exploração de cultivos naturais de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (SAITO; OLIVEIRA, 1990; REIS; YONESHIGUE-VALENTIN; DOS SANTOS, 2008) e alguns cultivos experimentais de *K. alvarezii* na costa Sudeste do Brasil permitidos legalmente a partir de julho de 2008 (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; BULBOA; PAULA; CHOW, 2007; GÓES, 2009).

Atualmente vem sendo estudada, através de cultivos experimentais, a implantação da produção desta alga exótica no litoral da Região Sul, em Florianópolis – Santa Catarina pelo Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

A extensa variedade de estruturas químicas híbridas κ/ι , como é o caso da carragenana extraída de *K. alvarezii*, originou interesse para a caracterização de suas propriedades estrutural e funcional (BIXLER; JOHNDRO; FALSHAW, 2001; FALSHAW; BIXLER; JOHNDRO, 2003; VILLANUEVA et al., 2004) e para o entendimento das interações entre as estruturas químicas complexas e as propriedades físicas e reológicas (VAN DE VELDE, 2001; VAN DE VELDE et al., 2005).

Atualmente o potencial dos polissacarídeos de algas como medicamento tem sido foco de atenção. Porém, estudos sobre os efeitos provocados pelas carragenanas bioativas em humanos são inconclusivos. A carragenana pode apresentar propriedades diversas, o que reflete muito provavelmente diferentes dosagens e formas de administração, como também uma heterogeneidade na preparação das carragenanas (TSUJI et al., 2003; ZHOU et al., 2006; ZÚÑIGA; MATSUHIRO; MEJÍAS, 2006; MALAWISTAL; CHEVANCE, 2007). O alto peso molecular da carragenana diminui sua solubilidade e limita a bioatividade. Sendo assim, carragenanas degradadas, atingindo baixo peso molecular, podem ter efeitos por vezes maléficos no organismo humano (SCF, 2003; ZHOU et al., 2006). Além disso, carragenanas do tipo λ tem maior atividade biológica de que outros tipos, como κ (ZHOU et al., 2006). Em vista disso, a caracterização do tipo e das propriedades químicas, físicas e reológicas das carragenanas utilizadas em alimentos é de suma importância, tanto para saúde dos consumidores quanto para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios com melhores propriedades sensoriais e nutricionais.

A qualidade da carragenana geralmente é julgada em termos de sua performance técnica como agente gelificante (força do gel) e como espessante (viscosidade). Um fator importante que a indústria deve considerar na utilização de *K. alvarezii* é que a composição química e, consequentemente as propriedades reológicas, de sua carragenana pode ser significativamente afetada pelos diferentes processos de extração. Isto significa que a temperatura e o tempo de extração influenciam na qualidade do polímero resultante (MONTOLALU et al., 2008). Porém, até então, os parâmetros, como tempo e temperatura usados para extração de carragenana de algas marinhas variam em diversos estudos (MUÑOZ, FREILE-PELEGRÍN, ROBLEDO, 2004; HAYASHI; PAULA; CHOW, 2007a; HAYASHI et al., 2007b; REIS;

YONESHIGUE-VALENTIN; DOS SANTOS, 2008; HUNG et al., 2009; PEREIRA et al., 2009a). Além disso, se a carragenana para fins industriais puder ser obtida sem tratamento alcalino e sem a precipitação alcoólica, o processo de extração pode ser mais atrativo tanto do ponto de vista ecológico como econômico.

A seleção do hidrocolóide para aplicação em determinado alimento é definida pela característica funcional requerida, mas também é inevitável a influência do preço e segurança no fornecimento. Portanto, a otimização do processo de extração, através da qual é obtido maior rendimento e um produto de melhor qualidade, incentivará indústrias brasileiras a trabalharem na produção deste aditivo, reduzindo o gasto com importações.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de se utilizar uma metodologia alternativa de extração para a obtenção de carragenanas da linhagem tetrasporofítica marrom de *K. alvarezii*, sem tratamento alcalino prévio e sem utilização de etanol para a precipitação da carragenana. Na etapa de isolamento e obtenção foi adaptada a secagem por atomização (spray-dryer), o que reduz o tempo de obtenção da carragenana seca em pó e minimiza os custos e danos ambientais causados pelo uso de solventes orgânicos na etapa de precipitação. A Metodologia de Superfície de Resposta foi utilizada para determinar os efeitos das variáveis de extração (tempo e temperatura) sobre o rendimento, a força do gel e a viscosidade da carragenana de *K. alvarezii*, cultivada no litoral de Florianópolis (Santa Catarina/Brasil). Além disso, a caracterização química e reológica da carragenana nativa e de uma amostra de carragenana comercial foi realizada a fim de comprovar a qualidade da carragenana obtida experimentalmente.

Contudo, além de contribuir para o desenvolvimento de uma nova tecnologia de extração, este estudo vem incentivar a implantação do cultivo da alga exótica *Kappaphycus alvarezii* na região de Florianópolis, onde o potencial produtor está sendo estudado para considerar o potencial de aplicação da carragenana nativa na indústria de alimentos. Segundo Hilliou et al. (2006), esta linha de pesquisa está estimulando até mesmo o aumento da demanda de novas algas produtoras sendo que a produção de carragenana está em constante crescimento e novas aplicações industriais estão sendo estudadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex. Silva

A alga marinha *Kappaphycus alvarezii* (*Rhodophyta*, *Florideophyceae*, *Gigartinales*, *Areschougiaceae*) conhecida comercialmente como “cotonii”, foi descrita originalmente como *Euchema alvarezii* Doty, sendo posteriormente transferida para o gênero *Kappaphycus* Doty considerando-se características morfológicas, anatômicas e a grande quantidade de κ -carragenana (~74 %) em sua composição (HAYASHI, 2001; ESTEVEZ; CIANCIA; CEREZO, 2004). A existência de linhagens desta alga com pigmentações variadas (verde, vermelho, marrom) foi relatada na literatura. Diferenças em suas características fisiológicas, incluindo o desempenho do crescimento e rendimento em carragenana, têm sido relatadas em estudos laboratoriais (TRONO; LLUISMA, 1992; GERUNG; OHNO, 1997; MUÑOZ; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 2004).

Kappaphycus alvarezii está presente nos recifes rasos das Filipinas desde a década de 70 e mais recentemente em outros países tropicais, principalmente na Indonésia e Tanzânia (TRONO; LLUISMA, 1992; GERUNG; OHNO, 1997; PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999). A alga foi introduzida em inúmeras regiões do mundo para fins de pesquisa ou o desenvolvimento de uma indústria de cultivo comercial, porém, apenas Filipinas, Indonésia, Malásia (Sabah), Fiji e Tanzânia são produtores comerciais (MUÑOZ; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 2004).

Kappaphycus alvarezii é uma alga vermelha tropical, economicamente importante, visto que é a principal fonte de κ -carragenana no mundo (BIXLER, 1996). O mercado de carragenana continua crescendo e os cultivos atuais parecem incapazes de suprir a demanda quanto à qualidade, preço e volume exigidos pela indústria de processamento (ASK; AZANZA, 2002). A grande demanda de carragenanas no mercado mundial incentivou a produção comercial de algas produtoras (carragenofitas) através da maricultura. A indústria, entretanto, é desafiada com problemas como a baixa produção e exploração agrícola, menor qualidade do produto causada por práticas de manipulação pós-colheita inadequadas, por exemplo, índice de umidade elevada, presença de materiais estranhos (outras algas, areia,

materiais plásticos entre outros) e baixos rendimentos de carragenanas das colheitas tardias (TRONO; LLUISMA, 1992).

A importância econômica das espécies de *Kappaphycus* justifica os numerosos esforços que têm sido direcionados para determinação de áreas alternativas de cultivo e produção em várias partes do mundo. Até meados da década de 90, a produção de κ -carragenana no Brasil era pequena e restrita a exploração da alga nativa *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (SAITO; OLIVEIRA, 1990; REIS; YONESHIGUE-VALENTIN; DOS SANTOS, 2008). Devido ao insucesso do cultivo de espécies locais produtoras de carragenanas no Brasil, em 1990, foi proposta a introdução das espécies exóticas *Eucheuma* e *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex Silva como uma fonte alternativa de κ -carragenana para suprir o mercado local. Esta idéia motivou em 1995 um programa de introdução de *K. alvarezii* e *K. striatum* (Schmitz) Doty para avaliar os riscos ambientais desta introdução e a possibilidade econômica da maricultura na costa sudeste do Brasil – Ubatuba (SP) (PAULA; PEREIRA; OHNO, 1999; BULBOA; PAULA; CHOW, 2007). O programa de introdução foi bem sucedido e enfatizou o potencial de ambas as espécies para atividades de maricultura (BULBOA; PAULA; CHOW, 2007). Este fato incentivou, em 1998, a introdução de um clone de *K. alvarezii* trazido da Venezuela no litoral do estado Rio de Janeiro a fim de que o primeiro cultivo no Brasil em escala comercial fosse implantado (GÓES, 2009). Entretanto, as espécies foram mantidas em cativeiro controlado sob autorização legal pendente para expandi-la em escala comercial até que em julho de 2008 foi publicada no Diário Oficial da União a Instrução Normativa Nº 185 (IBAMA), que permitiu o cultivo de *K. alvarezii* entre a Baía de Sepetiba (RJ) e a Ilha Bela (SP) regulamentando efetivamente esta atividade no Brasil (GÓES, 2009).

Geralmente a carragenana é extraída com água quente, neutra ou alcalina de algas nativas. Trabalhos anteriores sobre extratos de algas nativas obtidos com água a temperatura ambiente ou aquecida mostraram que consistem em carragenanas de alto peso molecular com dispersão estrutural em torno de um padrão básico κ (na verdade κ/ι híbrida carragenana, com pequena quantidade de ι -estrutura), juntamente com menores quantidades do μ -precursor e pequenos traços de uma galactana altamente metilada (carragenana metilada) (ANDERSON; DOLAN; REES, 1973; ROCHAS; RINAUDO; LANDRY, 1989; ESTEVEZ; CIANCIA; CERESO, 2000; ESTEVEZ; CIANCIA; CERESO, 2004). Quantidades significantes de quatro

resíduos com ligações α -L-galactose sugerem a presença de estruturas de agaranas (ESTEVEZ; CIANCIA; CERESO, 2000).

A produção de biomassa e o rendimento em carragenana das algas são sazonais. Para o sucesso do cultivo a *K. alvarezii* requer água do mar não fria, altos níveis de iluminação, água enriquecida com nutrientes e alta movimentação da água (MUÑOZ; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO, 2004). Trono e Lluisma (1992) compararam a produção de biomassa e carragenana de duas linhagens de *Eucheuma denticulatum* (principal espécie para a produção de ι -carragenana) e duas de *Kappaphycus alvarezii* para avaliar a sazonalidade e suas capacidades de produção nas Filipinas. O rendimento em carragenana foi maior (43 a 53 % base seca) na primeira colheita realizada entre os meses de junho e outubro o que coincidiu com a produção elevada da biomassa. Os baixos rendimentos (21 a 33 %) da segunda colheita, entre os meses de outubro e fevereiro, coincidiram com a produção reduzida de biomassa. As quatro linhagens contrastaram em desempenho na terceira estação de colheita (fevereiro-julho) onde os rendimentos das duas linhagens de *E. denticulatum* foram elevados em biomassa e consequentemente em carragenana e, as duas linhagens de *K. alvarezii* mostraram baixos rendimentos (30 e 39 %) e baixa biomassa.

2.2 CARRAGENANA

Carragenana é um nome genérico dado à família de polissacarídeos extraídos de algas vermelhas (*Rodophytas*). Juntamente com alginatos e agares, carragenanas são parte de um grupo de substâncias complexas biopoliméricas denominadas ficocolóides. Estes polímeros naturais possuem a habilidade de formar géis termoreversíveis ou soluções viscosas quando adicionados a soluções salinas e por isso, são extensivamente usados como agentes de textura, espessantes em suspensões ou estabilizantes em várias aplicações industriais, em produtos alimentícios e farmacêuticos (PICULELL; VIEBKE; LINSE, 1995; LAHAYE, 2001; VAN DE VELDE et al., 2002; PRADO-FERNÁNDEZ et al, 2003; HILLIOU et al., 2006).

As carragenanas, assim como os hidrocolóides em geral, desempenham um papel importante na aceitabilidade geral de produtos alimentícios, aumentando a estabilidade física e melhorando a sensação do alimento na boca. Gomas e estabilizantes são incorporados em diversas formulações alimentícias para oferecer resistência a processos

físicos indesejados como: cristalização, sedimentação gravitacional e desagregação mecânica, que poderiam ocorrer durante a distribuição e o armazenamento dos produtos. A adição de gomas muitas vezes muda o caráter de percepção do alimento, tornando-o irreconhecível. Estas mudanças podem ser vitais para alcançar a aceitabilidade do consumidor (HOUSKA et al., 1998; WILLIAMS; PHILLIPS, 2000).

Carragenanas podem ser usadas individualmente, ou como uma mistura de diferentes tipos de carragenanas, ou combinadas com outros polissacarídeos, proteínas e sais para se obter um produto final com as propriedades físicas desejadas (IMESON, 2000). Estas propriedades podem variar de acordo com a utilização industrial, sendo que, mesmo as carragenanas com menor força do gel têm uso potencial em novas aplicações, como substitutos de gordura, produtos de confeitaria com textura macia (coberturas) e alguns alimentos líquidos (WILKINSON; DIJKSTERHUIS; MINEKUS, 2000). Além disso, são utilizadas em muitos produtos lácteos, tais como em sobremesas congeladas (sorvetes), achocolatados, queijo cottage, chantilly, e, também não lácteos, como produtos instantâneos, geléias, rações e molhos (IMESON, 2000; VAN DE VELDE et al., 2002).

2.3 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

Carragenana é um polissacarídeo que compreende principalmente unidades de β -D-galactose e α -D-galactose, unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1-3)$ e $\beta(1-4)$ com grupos éster-sulfato e ligações anidro em diferentes posições (PRADO-FERNÁNDEZ et al. 2003). Os diferentes tipos de carragenana podem ser distinguidos por suas estruturas primárias. Por isso, são geralmente distribuídas em três categorias comerciais denominadas κ -carragenana, ι -carragenana e λ -carragenana, as quais são classificadas de acordo com a presença de ligações 3,6-anidro ligadas no resíduo de galactose e com a posição e o número de grupos sulfato. A κ -carragenana é composta de $\alpha(1-3)$ -D-galactose-4 sulfato e $\beta(1-4)$ -3,6-anidro-D-galactose alternadas; a ι -carragenana é composta por $\alpha(1-3)$ -D-galactose-4 sulfato e $\beta(1-4)$ -3,6-anidro-D-galactose-2 sulfato alternadas e, a λ -carragenana é formada por $\alpha(1-3)$ -D-galactose-2 sulfato e $\beta(1-4)$ -D-galactose-2,6 sulfato alternadas (MEUNIER; NICOLAI; DURAND, 1999; PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003; HILLIOU et al., 2006; VAN DE VELDE, 2008;).

Os tipos mais comuns de carragenanas são tradicionalmente identificados por prefixos gregos indicando o principal componente. Para descrever estruturas mais complexas de carragenanas, um código de nomenclatura uniforme baseado na abreviação lógica foi desenvolvido e aceito no mundo inteiro pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (KNUTSEN et al, 1994). Os códigos correspondentes as três carragenanas mais importantes comercialmente ι , κ e λ são G4S-DA2S, G4S-DA, e G2S-D2S,6S respectivamente.

Outros dois tipos, carragenanas μ (mu) e ν (nu), as quais são precursores biológicos de κ - e ι - carragenana, respectivamente, são frequentemente encontrados em carragenanas comerciais (VAN DE VELDE, 2008). As carragenanas μ e ν , como resultado do rearranjo interno pelo tratamento alcalino, formam κ e ι carragenanas. As unidades básicas dissacarídicas que se transformam nas várias carragenanas são apresentadas na Figura 1.

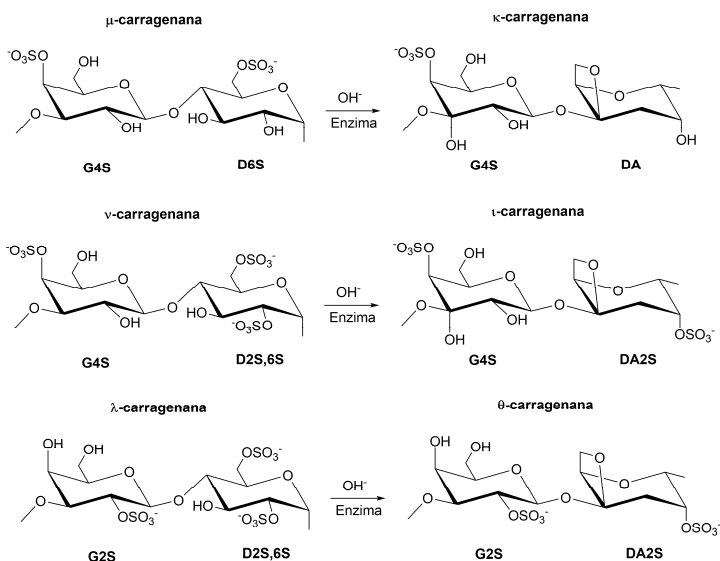


Figura 1 - Estrutura molecular dos monômeros da carragenana e conversões decorrentes dos tratamentos alcalino e/ou enzimático
 Fonte: PEREIRA et al., (2009b).

In vivo, κ - e ι -carragenana são formadas enzimaticamente por seus precursores através de sulfonidrolases (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). A presença de quantidades consideráveis de unidades de precursores em preparações de carragenana comercial tem forte efeito negativo sob as propriedades funcionais (gelificantes) (VAN DE VELDE et al., 2002). Por isso, no processamento industrial a carragenana é submetida a tratamento alcalino ou extração alcalina, catalisando a reação de ciclização com OH^- (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; VAN DE VELDE et al., 2002).

Assim, tempos longos de reação e condições altamente alcalinas são usadas comercialmente para atingir um alto nível de conversão de precursores a κ - e ι -carragenana, maximizando a habilidade gelificante e/ou a reatividade com proteínas nos alimentos (FLASHAW et al., 2001). Porém em um estudo realizado por Hayashi et al. (2007b) em todas as amostras de *K. alvarezii* analisadas, com diversas formas de cultivo no Brasil, os rendimentos das carragenanas nativas, extraídas apenas com água, foram maiores do que os rendimentos das carragenanas modificadas por tratamento alcalino. Resultado também encontrado por Freile-Pelegrín, Robledo e Azamar (2006) com *Eucheuma isiforme*, fonte de ι -carragenana, cultivada no México, onde o rendimento diminuiu com o aumento da concentração alcalina. Ambos declararam que isto pode ser esperado devido a uma degradação parcial do polissacarídeo com o tratamento alcalino.

O arranjo dos monômeros (unidades dissacarídicas de carragenana) e suas respectivas quantidades na macromolécula são específicos para cada tipo de alga que produz a carragenana, e dependem do ciclo biológico da alga (HILLIOU et al., 2006). Por isso, análises quantitativas dos diferentes tipos de carragenanas são de enorme importância tanto para fornecedores de ingredientes como para as indústrias de alimentos disponibilizarem um produto de qualidade constante e desenvolverem aplicações baseadas em propriedades intrínsecas únicas (VAN DE VELDE et al., 2002).

Carragenanas híbridas ganham maior atenção no mundo científico e também em aplicações industriais (VAN DE VELDE et al., 2005). A relação entre a estrutura molecular e as propriedades funcionais é o tema principal de pesquisas sobre carragenana. A maioria desses artigos lida com carragenanas comerciais κ e ι obtidas pela extração de algas tropicais *Kappaphycus alvarezii* (nome comercial *Eucheuma cottonii* ou simplesmente Cottonii) e *Eucheuma denticulatum* (nome comercial *Eucheuma spinosum* ou simplesmente Spinosum), respectivamente (VAN DE VELDE et al., 2002). Infelizmente, essas

amostras de carragenanas não são homogêneas sendo que amostras de carragenana κ e ι contêm impurezas de carragenana ι e κ , respectivamente (ROCHAS; RINAUDO; LANDRY, 1989; VAN DE VELDE, 2001; VAN DE VELDE et al., 2005; VAN DE VELDE, 2008). Em princípio, estes estudos são baseados nas propriedades de carragenanas híbridas - κ/ι . Portanto, estudos detalhados sobre a dependência da composição nas diferentes propriedades das carragenanas híbridas são de crucial importância (VAN DE VELDE, 2008).

As estruturas distintas de carragenana diferem na presença do resíduo de 3,6-androgalactose e no conteúdo de éster sulfato. Variações nestes componentes influenciam a hidratação, força, textura e fusão do gel, sinerese e sinergismo. Estas diferenças criadas através da alga são controladas processando e misturando extratos diferentes (IMESON, 2000). Portanto, as propriedades que fazem as carragenanas tão utilizadas em diferentes aplicações comerciais, particularmente na indústria de alimentos, não dependem somente da sua estrutura química e da composição (especialmente conteúdo de sulfato e potássio ou cálcio), mas também na proporção em que as carragenanas podem ser misturadas para obter a capacidade de gelificação desejada. Isto significa que identificar e quantificar cada tipo de carragenana é de suprema importância para a melhoria de seu desempenho em aplicações, a fim de preparar a mistura mais apropriada comercialmente para cada aplicação particular. A caracterização industrial de várias carragenanas em uma dada mistura/combinção (obtidas após refinamento do produto natural das algas) é realizada medindo diferentes propriedades físicas, tais como viscosidade, solubilidade e força do gel e relacionando a percentagem de cada composto (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003).

2.3.1 Carragenanas híbridas

De acordo com Van de Velde (2001) carragenanas híbridas, como por exemplo κ/ι , consistem tanto de unidades repetidas κ como ι . Isto é, cadeias onde se encontram blocos de κ e ι , ou unidades de κ e ι randomicamente distribuídas ao longo da cadeia. Estas afirmações foram respaldadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C combinada com outras análises da composição de monossacarídeos, como polarimetria e viscosimetria.

Diferentes tipos de carragenanas híbridas têm sido descritas, tais como galactanas híbridas D/L (híbridas de carragenanas e agars), híbridas κ/ι , κ/β , ξ/θ , ν/ι , e mais estruturas complexas contendo unidades repetidas metiladas ou piruvatadas (VAN DE VELDE, 2008). Diferentes espécies de algas produzem híbridos κ/ι com diferentes razões de κ/ι . A via biossintética levando a carragenanas híbridas κ/ι ainda não é clara. Por isso, a estrutura molecular destes híbridos tem sido assunto de debate. Atualmente, a natureza do híbrido é testada para extratos híbridos de várias espécies usando diferentes técnicas. O fracionamento com KCl combinado com espectroscopia RMN (Ressonância Magnética Nuclear) é um dos métodos mais testados para provar a natureza dos híbridos κ/ι . Este método é usado para separar misturas de carragenanas κ e ι e é aplicado nas condições em que κ -carragenana forma um gel e ι -carragenana não. Nestas condições, os híbridos não mostram separações dentro de uma fase gelificada rica em κ e uma fase líquida rica em ι (isso pode ser confirmado por análises em ^1H -RMN), o que comprova a estrutura heteropolimérica de carragenanas extraídas de algumas algas específicas (VAN DE VELDE et al., 2002; VAN DE VELDE et al., 2005; VAN DE VELDE, 2008). As técnicas dominantes usadas para analisar razões de κ/ι são espectroscopia de RMN e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) ou espectroscopia Raman com transformada de Fourier (FT-Raman) (VAN DE VELDE et al., 2002; PEREIRA et al., 2003; VAN DE VELDE et al., 2005).

Carragenanas híbridas κ/ι (sinônimos: κ -2, kappa-2, κ fraca, κ de fraca gelificação) possuem um conteúdo de moléculas κ de 80 a 45 % (BIXLER; JONHDRO; FALSHAW, 2001; VILLANUEVA et al., 2004; VAN DE VELDE, 2008). Apesar de uma mesma espécie de alga mostrar variação na fração de κ nos diversos estudos, em geral, esta fração é similar para a mesma espécie. Confirmando que uma determinada alga produz uma espécie específica de híbridos κ/ι , cujas razões κ/ι não dependem de variações sazonais, como a hora e o local da colheita (VAN DE VELDE, 2008).

2.3.2 Grupos ésteres sulfato e ligações 3,6-anidro em galactose

Os grupos sulfato são acoplados covalentemente por meio de ligações éster aos átomos de carbono C-2, C-4 ou C-6 de resíduos individuais de galactose. A quantidade de $-\text{O}-\text{SO}_3$ nos polissacarídeos sulfatados pode ser considerável em várias proporções entre 0 e 41 %

(m/m), resultando em polímeros altamente carregados negativamente (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Em carragenanas comerciais o conteúdo de sulfatos está entre 22 e 38 % (m/m) (VAN DE VELDE et al., 2002). As carragenanas κ , ι e λ têm conteúdo de sulfato de 20 a 22 %, 32 a 33 % e 38 a 41 % (m/m) respectivamente. Entretanto, grandes variações podem ocorrer devido às diferentes espécies de algas marinhas utilizadas na extração. Portanto, cada carragenana é um complexo polissacarídeo baseado em galactose que tem diferentes quantidades de ésteres sulfato em diferentes posições e com diferentes distribuições. Por isso, os grupos sulfato são um importante substituinte estrutural das cadeias de galactose. Uma análise rápida e reproduzível do conteúdo de éster sulfato é importante para estudar: (1) algas-marinhas como matéria-prima, (2) as propriedades reológicas dos polímeros, (3) suas aplicações em alimentos e cosméticos, (4) sua possível aplicação biomédica (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

κ e ι carragenanas contêm ligações 3,6-anidro na ligação $\alpha(1-4)$ do resíduo D-galactopiranoose, no entanto, λ carragenana não possui ligações anidro. As carragenanas não gelificantes μ e ν , precursores naturais de κ - e ι -, respectivamente, têm um grupo sulfato éster no C-6 do resíduo da unidade dimérica de D-galactopiranoose. As ligações 3,6-anidro são formadas pela eliminação do grupo sulfato do C-6 (VAN DE VELDE et al., 2002). A formação de ligações anidro força a geometria da molécula de açúcar a mudar da forma normal de cadeira 4C_1 , na qual C(6) e O(3) são amplamente separados uns dos outros em posições equatoriais, a forma 1C_4 , onde ambos são axiais e estão perto suficiente para permitirem a formação de uma ligação covalente entre eles. Como consequência direta a inversão do anel de 4C_1 para 1C_4 as ligações nas posições 1 e 4 são convertidas de axial para equatorial. Somente o arranjo diequatorial é compatível com a adoção da estrutura de duplas hélices requerida para a formação do gel (CIANCIA et al., 1993; DE RUITER; RUDOLPH, 1997; HARRINGTON et al., 2009).

Embora a estrutura idealizada da carragenana seja composta de unidades dissacarídicas repetidas, outros carboidratos (por exemplo: xilose, glucose e ácidos urônicos) podem estar presentes nas preparações de carragenanas. A carragenana nativa é, portanto, uma mistura de polissacarídeos não homólogos (VAN DE VELDE et al., 2002).

2.3.3 Estabilidade ácida

Para polissacarídeos sulfatados, como a carragenana, há um risco potencial da hidrólise dos grupos sulfato o que alterará a composição da unidade de repetição. O tamanho da molécula do polímero em solução em uma determinada força iônica vai mudar dependendo do grau de dessulfatação (de corda aleatória para haste rígida), visto que os grupos sulfato determinam a carga total e a distribuição da carga no polímero. Soluções de carragenanas perderão viscosidade e força do gel em sistemas com valores de pH abaixo de aproximadamente 4,3. Este efeito é devido à auto-hidrólise que ocorre em valores baixos de pH, visto que a ligação de 3,6-anidrogactose é clivada em ambiente ácido (MYSLABODSKI; STANCIOFF; HECKERT, 1996; KARLSSON; SINGH, 1999).

A perda dos grupos sulfato resultará em um polímero com a conformação menos extensa e mais flexível, devido à menor repulsão eletrostática intramolecular. A molécula de polissacarídeo dessulfatada, portanto, efetivamente, se comporta como uma pequena molécula em solução comparada à outra molécula do mesmo grau de polimerização, mas sem alterações no grau de sulfatação (KARLSSON; SINGH, 1999).

A razão da auto-hidrólise aumenta em elevadas temperaturas e baixos níveis de cátion. Uma vez resfriadas abaixo da temperatura de gelificação, a carragenana retém os íons potássio unidos a cadeia de sulfatos e isto previne o procedimento de auto-hidrólise. Conseqüentemente, em produtos ácidos, a carragenana seria adicionada no último momento, para evitar a excessiva degradação ácida e, se possível, o ácido deveria ser adicionado ao alimento imediatamente antes da embalagem e armazenamento para minimizar a degradação do polímero (IMESON, 2000).

A presença do anel anidro leva a formação de uma estrutura de piranosil deformada, resultando em uma molécula menos estável ao ataque ácido. Isto faz com que a unidade de anidrogactose hidrolise a uma taxa mais próxima a açúcares furanosil do que a piranosil. Das carragenanas comerciais, furcellarana (DA-G-DA-G4S), κ (DA-G4S) e ι (DA2S-G4S), todas contêm unidades de anidrogactose (DA). λ -carragenana (D2,6S-G2S-D2S), sendo desprovida de unidades DA, hidrolisa a taxas menores quando comprada às outras carragenanas. Sabe-se que a ι -carragenana é mais estável a hidrólise ácida de que a κ -carragenana. Esta estabilidade é atribuída à presença de um sulfato extra (DA2S). Portanto, a κ -carragenana exibe as maiores taxas de reação em

relação a hidrólise ácida entre as carragenanas utilizadas comercialmente (MYSLABODSKI; STANCIOFF; HECKERT, 1996).

2.3.4 Reatividade

O mecanismo da reatividade da carragenana com produtos lácteos não é totalmente compreendido, mas acredita-se envolver a formação de uma rede eletrostática através da associação das cargas negativas do polissacarídeo em sua conformação ordenada (duplas hélices) a uma região de carga positiva da estrutura primária de moléculas de κ -caseína, as quais estão localizadas na superfície das micelas (LANGENDORFF et al., 1999; LANGENDORFF et al., 2000; MARTIN et al., 2006; ARLTOFT; MADSEN; IPSEN, 2008; HARRINGTON et al., 2009).

Carragenana é tipicamente usada para produtos em gel com um pH próximo a neutralidade com atração molecular entre grupos NH_3^+ da proteína, carregados positivamente, e grupos OSO_3^- da carragenana. Associação de κ -carragenana com micelas de caseína em pH neutro é impulsionada pela atração de carragenana negativamente carregada ao fragmento positivo entre os resíduos dos aminoácidos 97 e 112 da κ -caseína, embora neste pH, a carga global das micelas de caseína é negativa (LANGENDORFF et al., 2000; JI; CORREDIG; GOFF, 2008).

κ -carragenana geralmente é adicionada a produtos lácteos com outros polissacarídeos para evitar a separação de fases. As micelas de caseína desempenham um papel importante nas propriedades funcionais gelificante e estabilizante de κ -carragenana. É aceito que a interação entre κ -carragenana e micelas de caseína é dependente da concentração de κ -carragenana, ou seja, em altas concentrações de κ -carragenana, as interações entre as moléculas de carragenana são favorecidas e micelas de caseína são presas dentro de uma rede contínua tridimensional. Em concentrações abaixo da de gelificação, interações de κ -carragenana são fundamentais para a estabilização das dispersões de proteínas no leite, no entanto, o mecanismo exato da associação de κ -carragenana com caseínas ainda está sob investigação (JI; CORREDIG; GOFF, 2008).

2.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Todas as carragenanas são solúveis em água quente, ou seja, acima da temperatura de fusão do gel que varia de 40 °C a 70 °C, dependendo da concentração e cátions presentes. Outras formas de sais, normalmente K^+ e Ca^{++} de carragenanas κ e ι não são solúveis, mas expandirão em função da concentração e do tipo de cátion presente. As carragenanas κ e ι , em particular, exibem um fluido com baixa viscosidade a altas temperaturas (LARA, 1991; IMESON, 2000).

Propriedades espessante e gelificante dos diferentes tipos da carragenana são completamente distintas. Por exemplo, a κ -carragenana forma um gel firme com íons potássio, enquanto a ι e a λ são apenas levemente afetadas. A ι -carragenana interage com íons de cálcio resultando géis macios e elásticos, porém estes sais não têm nenhum efeito sobre as propriedades da λ -carragenana. Aplicações destas combinações requerem experiência e conhecimento sobre carragenanas (IMESON, 2000).

Carragenanas comerciais têm massa molecular média de 400.000 a 600.000 g mol⁻¹ (VAN DE VELDE et al., 2002). Os extratos de κ -carragenana comercial estão entre 400.000 e 560.000 g mol⁻¹ e da alga *Eucheuma* processada tem massa molecular ligeiramente maior que 615.000 g mol⁻¹. Todas as carragenanas contêm uma fração (<5 %) de material abaixo de 100.000 g mol⁻¹, este material de baixa massa molecular acredita-se ser inerente epifitas (IMESON, 2000). De um modo geral, a redução na massa molecular resulta em perda de consistência do gel, menor sinerese e reduzida turbidez (LARA, 1991).

Devido ao frequente uso de carragenana em alimentos e fármacos, muitas avaliações toxicológicas foram realizadas. O principal problema identificado envolve frações da baixa massa molecular (< 20 000 g mol⁻¹) que podem causar lesões (KARLSSON; SINGH, 1999). Tobacman; Wallace; Zimmerman (2001) debateram sobre os riscos potenciais associados ao consumo de carragenana na dieta. Na verdade o debate gira em torno da carragenana degradada (ou poligenana, como vem sendo chamada) a qual tem massa molecular média de 10.000 a 30.000 g mol⁻¹. Um grupo argumenta que a presença de carragenana em alimentos pode acarretar problemas à saúde devido à presença de poligenana (TOBACMAN; WALLACE; ZIMMERMAN, 2001). Outro grupo argumenta que a quantidade de poligenana na carragenana e os níveis de consumo da carragenana na dieta não apresentam nenhum risco à saúde humana (COHEN; ITO, 2002). Em 2003 o *European*

Scientific Committee on Food publicou os resultados de sua revisão sobre este debate. Foi proposto que “se possível um limite não maior que 5% abaixo de $50.000 \text{ g mol}^{-1}$ deveria ser introduzido na especificação para assegurar que a presença de carragenana degradada seja mantida a um mínimo”. Por isso, e pelas alterações que possam ocorrer nas propriedades funcionais da carragenana, as análises e o monitoramento da massa molecular são de fundamental importância.

Spichtig e Austin (2008) utilizaram um método baseado em cromatografia de exclusão molecular de alta eficiência acoplada a um detector de índice de refração (HPSEC-RI) para medir o traço de baixa massa molecular em carragenanas e em produtos finais contendo carragenana (geléias). Os resultados apontaram que cerca da metade das amostras analisadas estavam dentro do limite de 5 % e quase todas continham abaixo de 8 % de traços de carragenana de baixa massa molecular. A pesquisa também demonstrou que a quantidade de carragenana degradada pode ser minimizada durante o processamento mantendo-se o pH acima de 4,0 e minimizando o tempo de exposição a condições de baixo pH.

Uma vez que a carragenana é geralmente utilizada por suas propriedades gelificantes, é de extrema importância, por razões econômicas, manter a máxima força do gel nas condições de utilização. Por isso, tempos de processamento em diversas condições de temperatura e pH devem ser avaliados na indústria de alimentos. Quanto menor o pH e maior a temperatura de processamento, mais degradada será a carragenana (MYSLABODSKI; STANCIOFF; HECKERT, 1996). A degradação da carragenana pode ser de natureza térmica, oxidativa ou hidrolítica. Carragenana degradada pode estar presente na matéria-prima devido ao armazenamento em longo prazo ou pode ser produzida durante o processamento, influenciando sua funcionalidade quanto a formação de gel ou quanto ao aumento da viscosidade em alimentos (KARLSSON; SINGH, 1999). Visto que a carragenana em solução é suscetível a hidrólise ácida, a redução da massa molar pode ocorrer até mesmo “*in vivo*” no ambiente gástrico ácido, após a ingestão (CARPON; YVON; MULLER, 1996).

2.4.1 Gelificação

Muitos autores (VIEBKE; PICULLEL; NILSSON, 1994; PICULELL; VIEBKE; LINSE, 1995; DE RUITER; RUDOLPH, 1997;

MEUNIER; NICOLAI; DURAND, 1999; PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003) têm demonstrado que a gelificação envolve a formação de duplas hélices de cadeias de galactanas. O evento primário relacionado ao processo de gelificação é a conversão de cordas desordenadas aleatoriamente a duplas hélices co-axiais.

A gelificação da carragenana é associada com uma transição conformacional, que sob resfriamento e/ou sob adição de cátions, passa de uma cadeia aleatória em solução à hélices com agregação (PICULELL; VIEBKE; LINSE, 1995). O conteúdo de sulfatos (carga negativa da hélice) requer a presença de cátions neutralizadores, tais como potássio ou cálcio (“promotores do gel”) para associar as hélices em um grande aglomerado macromolecular e assim ocorrer a gelificação. Neste processo as unidades 3,6-anidro- α -D-galactopirranose são tão essenciais como suas três ligações equatoriais C-H, aumentando a flexibilidade da cadeia. Qualquer substituição destas unidades por grupos sulfato na cadeia fará com que as propriedades de gelificação diminuam como acontece com a λ -carragenana, que não forma gel (DE RUITER; RUDOLPH, 1997; PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003).

Uma vez que as hélices são formadas, elas se agregam sob determinadas condições críticas de sais e temperatura (VIEBKE; PICULELL; NILSSON, 1994) como demonstrado pela histerese entre a κ -carragenana em temperatura de congelamento e em temperatura de fusão do gel. Entretanto, tal histerese térmica não existe para ι -carragenana, sugerindo um diferente mecanismo de gelificação (PICULELL; NILSSON; MUHRBECK, 1992).

No caso da κ -carragenana um mínimo de quatro unidades repetidas de dissacarídeos é necessário para observar a transição conformacional (ROCHAS; RINAUDO; VINCENDON, 1983). Esta ordenação começa de um local de iniciação e então cooperativamente se estende ao longo da cadeia. A transição cinética e, consequentemente o processo de gelificação, depende da massa molar e da concentração do polímero, como também do conteúdo de sais (força iônica), da natureza dos íons e da temperatura da solução (ROCHAS; RINAUDO, 1980; NORTON et al., 1983; VIEBKE; PICULELL; NILSSON, 1994; PICULELL; VIEBKE; LINSE, 1995; MICHEL; MESTDAGH; AXELOS, 1997; MEUNIER; NICOLAI; DURAND, 1999; PEKCAN; TARI, 2008).

As transições térmicas sol-gel e gel-sol de misturas de κ -carragenana/água, metilcelulose/água e metilcelulose/ κ -carragenana/água foram investigadas por Tomsic, Prossnigg e Glatter (2008) utilizando SAXS (espalhamento de raios-X a baixos ângulos),

DSC (calorimetria exploratória diferencial) e experimentos reológicos oscilatórios em temperaturas entre 20 e 80 °C e concentrações de 1 a 2 %. Na transição gel-sol: para concentração de 1 % de κ -carragenana na mistura κ -carragenana/água a temperatura média dos três métodos de análise foi 43 °C, já para a concentração de 2% a temperatura foi aproximadamente 54 °C. Para a transição sol-gel: na concentração de 1 % de κ -carragenana a transição ocorreu em aproximadamente 29°C e, para uma concentração de 2 % a temperatura de transição aumentou para 37 °C. Portanto, na mistura κ -carragenana/água as temperaturas de transição aumentaram conforme aumentou a concentração de carragenana na mistura de κ -carragenana e água nos três métodos de análise utilizados.

O mecanismo preciso da indução do sal à gelificação da κ -carragenana continua sendo motivo de debates e controvérsias. Embora haja um acordo sobre duas etapas no mecanismo de gelificação, isto é, uma transição corda-hélice seguida pela agregação das hélices, a natureza exata destas hélices e a maneira como o gel é formado ainda é discutido (NORTON et al, 1983; MEUNIER; NICOLAI; DURAND, 1999). A estrutura do local da agregação e do gel tem sido estudada por difração de raios-X na tentativa de elucidar a estrutura helicoidal (MEUNIER; NICOLAI; DURAND, 1999). A estrutura em grande escala tem sido estudada usando microscopia (BORGSTRÖM et al., 1996; MEUNIER; NICOLAI; DURAND, 1999).

Considerando a seletividade de íons para transição conformacional da carragenana, foram distinguidos três grupos de cátions com respeito a sua eficiência em promover hélices: cátions monovalentes não específicos (Li^+ , Na^+ e $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$), cátions divalentes não específicos (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+}) e os cátions monovalentes específicos (NH_4^+ , K^+ , Cs^+ e Rb^+) os quais se vinculam às hélices (PICULELL; VIEBKE; LINSE, 1995). Pela escolha de sais e concentrações apropriados, diferentes associações helicoidais de κ -carragenana podem ser obtidas variando de cristais líquidos nemáticos, usando segmentos de κ -carragenana em NaI/CsI, a cordas helicoidais duplas e grandes cordas helicoidais (PICULELL et al., 1997). ι -Carragenana é incapaz de formar cristais líquidos (BORGSTRÖM et al., 1998), novamente refletindo diferenças entre o comportamento de κ - e ι -carragenanas e suas associações moleculares. A dependência do sal na formação de gel da ι -carragenana é também bem documentada com Ca^{2+} mostrando um efeito estabilizador da hélice (ROCHAS; RINAUDO, 1980; PICULELL; VIEBKE; LINSE, 1995). As pequenas especificidades da gelificação da ι -carragenana com alguns cátions

monovalentes são interpretadas como resultado das pequenas proporções de κ -carragenana em ι -carragenana (NORTON et al., 1983), propriedades que também afetam a reologia do gel (PICULELL; NILSSON; MUHRBECK, 1992).

Michel, Mestdagh e Axelos (1997) reportaram um estudo sistemático sobre a influência de cátions no estado físico e propriedades reológicas de κ - e ι -carragenana. Sabendo que cada sal tem uma atividade específica em cada tipo de carragenana, para o módulo elástico (G') foi determinada uma razão cátion/polímero sempre maior para κ -carragenana comparada a ι -carragenana. Para ι -carragenana, G' aumentou lentamente com concentração de sal monovalente e mais rapidamente com concentração de sal divalente. Ao contrário, para κ -carragenana, G' aumentou mais rapidamente na presença de potássio (cátion monovalente – KCl) do que com cálcio ou cobre (cátions divalentes). Entretanto para altas concentrações, G' tornou-se independente do tipo e da concentração de cátions na solução de κ -carragenana.

Os géis de carragenana são termicamente reversíveis e exibem histerese ou uma diferença entre a temperatura de solidificação e de fusão. Estes géis são estáveis à temperatura ambiente, mas podem ser novamente derretidos por aquecimento acima da temperatura de gelificação. Soluções de κ e ι carragenanas, quando resfriadas, levam a formação de géis com texturas diversas dependendo dos cátions presentes (IMESON, 2000).

A composição iônica de um alimento é importante para a efetiva utilização da carragenana. Por exemplo, a κ -carragenana é selecionada para estabilizar as zonas de junção de íons potássio do alimento dentro do gel firme e frágil. A ι -carragenana é selecionada para estabilizar íons de cálcio que fazem a ponte entre cadeias adjacentes para formar um gel macio e elástico. A presença destes íons também tem um efeito sobre a temperatura de hidratação da carragenana e, consequentemente, sobre as temperaturas de solidificação e de fusão. Por exemplo, a ι -carragenana hidratará a temperatura ambiente em água, mas a adição de sal aumenta o ponto do gel, então a solução é convertida em um gel com pontos distintos de elasticidade, o qual é usado para preparações a frio, como molhos para saladas. Sais de sódio da κ -carragenana hidratarão a 40 °C, mas a mesma carragenana em uma salmoura de carne mostrará uma hidratação completa somente a 55 °C ou acima desta (IMESON, 2000).

2.4.2 Propriedades reológicas

A reologia é a ciência que estuda a relação entre a deformação do fluido devido à força nele aplicada (CAMPOS, 1989). Ela descreve o comportamento de fluxo de materiais, principalmente aqueles relevantes industrialmente com propriedades intermediárias entre sólidos e líquidos ideais (DORAISWAMY, 2002; SCHRAMM, 2006).

Um atributo de grande importância em produtos alimentícios é a viscosidade, a qual é definida como a medida da resistência do fluido ao fluxo quando uma tensão é aplicada. A viscosidade é dada pela relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação, o que caracteriza o comportamento de fluxo de alimentos fluidos, classificando-os em Newtonianos e não-Newtonianos (STOKES; TELFORD, 2004; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; SCHRAMM, 2006).

O fluido que apresenta uma relação linear entre taxa de deformação e tensão de cisalhamento, ou seja, a viscosidade constante, é chamado de Newtoniano. Portanto, fluidos Newtonianos têm comportamento característico onde a viscosidade não depende da taxa de deformação. Por outro lado, quando a relação entre taxa de deformação e tensão de cisalhamento não é constante e depende ainda do tempo de observação ou de forças de recuperação elástica, o fluido é chamado não-Newtoniano (CAMPOS, 1989; BRETAS; D'AVILA, 2000; ABU-JDAYIL, 2003; TABILO-MUNIZAGA; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005; SCHRAMM, 2006).

O comportamento reológico dos hidrocolóides é de especial importância quando são usados para modificar atributos relacionados à textura (MARCOTTE; HOSHAHILI; RAMASWAMY, 2001). As características reológicas são percebidas principalmente pelo tato e, em pequena extensão, pela visão influenciando a aceitabilidade do consumidor a determinado produto (CAMPOS, 1989).

Além disso, dados reológicos são necessários para o cálculo de qualquer processo que envolva fluidos (por exemplo: fluxo de dimensionamento de bomba, extração, filtração, extrusão, purificação) e desempenham um papel importante nas análises das condições de fluxo em processos envolvendo alimentos, como pasteurização, evaporação, secagem e processamento asséptico (MARCOTTE; HOSHAHILI; RAMASWAMY, 2001).

Soluções de polissacarídeo normalmente exibem comportamento Newtoniano a concentrações abaixo de uma determinada concentração

que varia para cada polissacarídeo de acordo com a sua massa molar. Entretanto acima desta concentração um comportamento não-Newtoniano é observado (WILLIAMS; PHILLIPS, 2000). As carragenanas cobrem grande variedade de comportamentos reológicos desde espessantes viscosos a géis termicamente reversíveis, os quais variam na textura, de suaves e elásticos a firmes e frágeis (IMESON, 2000). Por exemplo, a κ -carragenana corresponde ao polímero menos sulfatado e conduz um gel forte e elástico que apresenta histerese térmica. Em contraste, a λ -carragenana corresponde a estrutura mais sulfatada, a qual não pode formar hélices em solução e conseqüentemente não exibe propriedades gelificantes, sendo associada apenas ao aumento da viscosidade (HILLIOU et al., 2006).

Pequenas deformações reológicas oscilatórias têm sido utilizadas para medir o módulo elástico (G') e módulo viscoso (G'') como uma função da composição híbrida κ/ι (VAN DE VELDE et al., 2005; HILLIOU; GONÇALVES, 2007). Um conjunto selecionado e purificado de carragenanas híbridas κ/ι variando de praticamente κ -carragenana homopolimérica a praticamente ι -carragenana homopolimérica foi analisado por Van de Velde et al. (2005). As propriedades físicas destas misturas híbridas diferiram consideravelmente de misturas homopoliméricas de κ e ι -carragenana. A maior força do gel, expressa nos termos de G' , foi observada para a κ -carragenana homopolimérica. Com o decréscimo de unidades κ a força do gel de carragenana híbrida κ/ι diminuiu. Por outro lado, a temperatura de gelificação de carragenanas híbridas κ/ι com diferentes razões, definida como o cruzamento dos módulos elástico e viscoso ($G'=G''$), não foi dependente da sua composição. O que permite que a força do gel seja controlada independentemente da temperatura de gelificação e de fusão.

2.4.2.1 Viscoelasticidade

Cada alimento tem a sua curva de escoamento característica e esta informação é muito útil para um grande número de aplicações industriais. Entretanto, muitos fenômenos não podem ser descritos apenas em função da viscosidade e o comportamento elástico deve ser levado em consideração. Materiais com estas características são chamados viscoelásticos (STEFFE, 1992).

O teste de relaxação é uma das maneiras de medir o comportamento viscoelástico de alimentos (PELEG, 1979). Este teste envolve a aplicação de uma deformação instantânea à amostra e a manutenção desta deformação ao longo do teste (CHANDRA; SOBRAL, 2000). Em uma curva de relaxação típica ocorre uma queda exponencial da tensão até um valor constante (assintótico), diferente de zero (PELEG, 1980). A ausência de relaxação é observada em sólidos elásticos ideais, enquanto materiais viscosos ideais relaxam instantaneamente (Figura 2) (STEFFE, 1996).

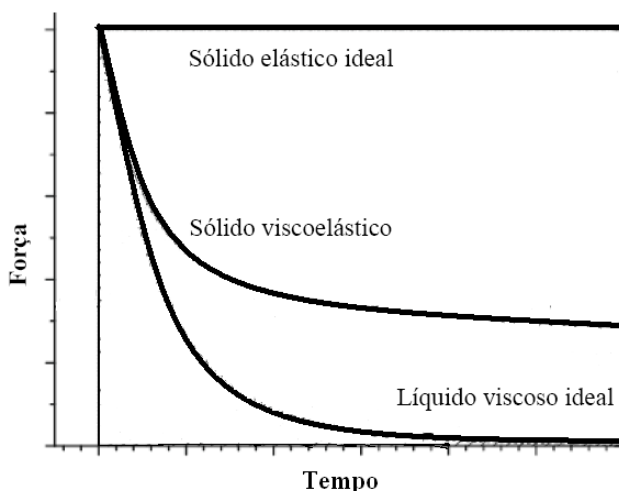


Figura 2 - Estrutura Curva típica de relaxação de materiais viscoelásticos

Fonte: Bellido e Hatcher (2009).

Muitos estudos têm sido realizados em alimentos utilizando os testes de relaxação com o objetivo de investigar o efeito da adição de ingredientes ou de modificações no processo de fabricação sobre as suas propriedades viscoelásticas. Na literatura, alguns modelos têm sido propostos para a descrição das curvas de relaxação e, conseqüentemente, predição dos parâmetros. Tradicionalmente, são utilizados modelos matemáticos (Maxwell) ou empíricos (Peleg) (PELEG, 1979; PELEG, 1980; LEE; ROSENAU; PELEG, 1983; KAMPF; NUSSINOVITCH, 1997; BARAVIAN; QUEMADA, 1998; FISZMAN; PONS; DAMÁSIO, 1998; MAMMARELLA, PIANTE VICÍN; RUBIOLO,

2002; LAURINDO; PELEG, 2007; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009; FRITZEN-FREIRE; MÜLLER; LAURINDO; PRUDÊNCIO, 2010).

2.4.2.2 Análise de textura instrumental

As propriedades mecânicas são manifestadas pela reação do alimento quando submetido a uma pressão, como por exemplo, na mastigação e na resistência ao corte. Essas propriedades estão relacionadas com as características de firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade, fraturabilidade, gomosidade e mastigabilidade. Os testes instrumentais de textura são geralmente baseados em força de compressão, que deformam a amostra até a penetração da sonda. Uma curva de deformação (força em função do tempo) é traçada (Figura 3) (FISZMAN, PONS, DAMÁSIO, 1998; BOURNE, 2002).

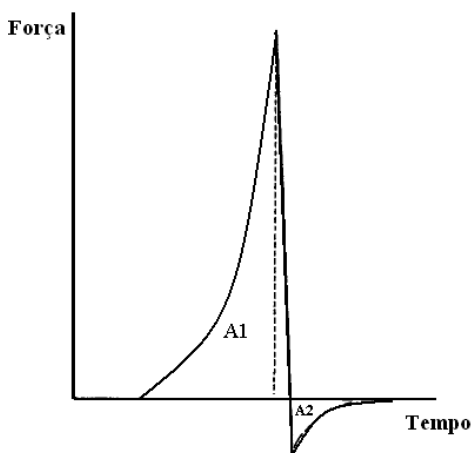


Figura 3 - Curva característica da análise de textura. O pico positivo é a força do gel, a área positiva (A1) é a consistência, a área negativa (A2) é a adesividade e, o pico negativo é a força máxima de adesão

Fonte: FISZMAN, PONS, DAMÁSIO, 1998.

Os dados referentes à força do gel variam em decorrência, principalmente, do tipo de equipamento utilizado nas medições, do modo de preparo do gel para as análises (que pode ser na concentração de 1,5 % ou 2,0 %), pelo acréscimo ou não de KCl 0,2 % para a

gelificação da carragenana, e pelo emprego ou não de tratamento alcalino previamente à extração (HAYASHI, 2001).

A força para romper o gel ou testes de penetração de géis de carragenana em água ou em leite são geralmente aplicados para estudar propriedades funcionais de diferentes híbridos κ/ι . A força do gel de carragenanas híbridas κ/ι é função da fração de unidades κ , a qual varia conforme a alga utilizada na extração e outros fatores como demonstrado por diversos autores (BIXLER; JOHNDRO; FALSHAW, 2001; FALSHAW; BIXLER; JOHNDRO, 2003; VILLANUEVA et al., 2004; VAN DE VELDE et al., 2005). Principalmente em altas concentrações de carragenana, a força do gel decresce com a redução da fração de unidades κ (VAN DE VELDE et al., 2005).

Análises das propriedades de textura são muito utilizadas para monitorar a qualidade sensorial do alimento. Em análises mecânicas de muitos alimentos, especialmente por teste de compressão, a precisa determinação de propriedades reológicas fundamentais é um processo dificultado pela falta de material teórico a respeito e freqüentemente condições de teste imperfeitas ou inapropriadas (PELEG, 1980).

A seleção da equação adequada deve ser baseada em um conhecimento prévio das propriedades gerais do material ou em alguma experiência anterior. Outra dificuldade no tratamento matemático adequado das análises reológicas surge do fato de que em materiais reais as respostas reológicas medidas são fortemente afetadas tanto pelo nível de tensão quanto pelo histórico de deformação da amostra (PELEG, 1980). Em muitos materiais de origem biológica, como a carragenana, este problema é agravado pela heterogeneidade e pela estrutura interna não uniforme que não permitem muitas das supostas simplificações em algumas teorias existentes.

2.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Os métodos de extração de carragenana descritos na literatura empregam diversos procedimentos para análise de seus teores e propriedades. Basicamente, envolvem lavagens da alga seca para remoção de sais, areia, resíduos e microrganismos, seguidas de digestão em água quente ou em soluções levemente alcalinas (HAYASHI, 2001; FREILE-PELEGRÍN; ROBLEDO; AZAMAR, 2006; HILLIOU et al., 2006; MONTOLALU et al., 2008).

Preparações de carragenanas podem conter misturas de duas origens diferentes. Alguns desses são componentes da biomassa das algas vermelhas, que não foram removidos no processo de isolamento da carragenana. Outros componentes (sais inorgânicos, sacarose, galactomananas) podem ser adicionados pelas indústrias para melhorar e/ou controlar alguma propriedade funcional de amostras de carragenana (solubilidade, viscosidade, força do gel, etc.). Pequenas contaminações e aditivos, tais como sais inorgânicos e açúcares podem ser removidos por diálise, antes das análises da estrutura química e das propriedades físicas (VAN DE VELDE et al., 2002).

Em cada produção, a matéria-prima e os parâmetros do processo são cuidadosamente controlados para produzir um grande número de extratos com propriedades bem definidas. Extratos individuais são caracterizados por sua elasticidade e propriedades gelificantes e, os produtos finais são fabricados pela combinação de vários extratos a fim de manter a qualidade da consistência de lote para lote e alcançarem as propriedades específicas necessárias para cada aplicação particular (IMESON, 2000).

2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.6.1 Espectroscopia no infravermelho

Espectroscopia no infravermelho é uma das técnicas vibracionais mais utilizadas para o estudo da composição química de ficocolóides. Esta técnica apresenta duas vantagens principais: requer pequenas quantidades de amostra (mg) e é um método não destrutivo, com precisão confiável (PEREIRA et al., 2003). No entanto, o método convencional de espectroscopia no infravermelho requer procedimentos trabalhosos para obter espectros com bom sinal. Esta limitação foi superada com o desenvolvimento da técnica de infravermelho associada com a transformada de Fourier (FTIR) e, mais recentemente da espectroscopia FTIR-ATR (de refletância total atenuada), que permite a determinação da composição de ficocolóides de algas secas, sem a necessidade de preparar pastilhas de KBr (Brometo de Potássio) (PEREIRA et al. 2009b).

Prado-Fernández et al. (2003) desenvolveram uma metodologia analítica para a determinação quantitativa de carragenanas em misturas

industriais empregando espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e regressão multivariada (“*partial least squares*”, PLS) permitindo o uso de amostras complexas e reduzindo etapas de pré-tratamento. A metodologia permitiu manuseio da carragenana dissolvida (líquida) a temperatura ambiente (prevenindo degradação) e sua medida direta em infravermelho utilizando filmes finos. Foi uma tentativa de reduzir consideravelmente o tempo gasto com análise e melhorar a sua aplicabilidade, visto que o método proposto neste estudo é rápido (pois os três principais tipos de carragenanas são simultaneamente avaliados), não destrutivo e prático para operações na rotina industrial. Neste estudo, espectroscopia FTIR-PLS resultou em uma metodologia confiável, rápida e eficiente para análise de carragenanas κ , ι e λ , representando uma ferramenta importante para o controle de qualidade destes produtos na indústria. O tempo total de análise requerido é cerca de 1h superando o desempenho das técnicas cromatográficas, onde são necessárias cerca de 4h para preparar e analisar a amostra.

Uy et al. (2005) estudaram a composição química de carragenanas extraídas de *Kappaphycus alvarezii* e de *Eucheuma denticulatum* por aquecimento através de microondas sem tratamento prévio. Os espectros no IR obtidos para estas duas amostras confirmaram que as algas continham principalmente carragenanas do tipo κ e do tipo ι respectivamente.

2.6.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A espectroscopia RMN (^1H - e ^{13}C - ressonância magnética nuclear) é uma das ferramentas utilizadas para determinação da estrutura química de amostras de carragenana. É usada nas indústrias e na pesquisa com diferentes abordagens correspondendo a diferentes interesses e objetivos. No primeiro caso, esta técnica é vista como uma ferramenta usada para projetar e determinar o possível valor comercial e industrial de extratos de matérias-primas obtidas de algas marinhas ainda não exploradas e usada também para controlar a qualidade de produtos de carragenana e estudar a influência dos parâmetros de processamento, tais como temperatura e pH, sob a estrutura. Diferentes abordagens são usadas quando o interesse é centrado em carragenanas biossintetizadas por algas ou na determinação de estruturas finas e/ou de uma fração de carragenana (VAN DE VELDE et al., 2002).

Quantificação de diferentes tipos de carragenanas em uma amostra por ^1H -RMN é baseada na posição e intensidade das ressonâncias dos hidrogênios α -anoméricos das unidades repetidas de α -D-galactose e anidrogalactose na região de 5.1 a 5.7 ppm. Por outro lado, os sinais de hidrogênios α -anoméricos de unidades de β -D-galactose são menos adequados tanto para fins de identificação quanto para fins de quantificação, considerando que os resíduos de β -D-galactose são idênticos para κ e ι -carragenana (unidades G4S), dando sinais nas mesmas regiões (VAN DE VELDE et al., 2002).

Espectroscopia de ^1H -RMN possui mais vantagens se comparada a ^{13}C -RMN, tais como a concentração da amostra (0,5 a 1 % m/m) e o menor tempo para análise. Em particular, é mais adequado para uma aproximação quantitativa dos diferentes tipos de carragenanas, embora os resultados quantitativos de grande precisão sejam muito difíceis de serem obtidos. No entanto, existe a possibilidade de obter a fragmentação específica com o uso de enzimas, o que poderia gerar fragmentos que, em solução, não alterem a viscosidade, tornando possível se obter espectros integrais com confiança. Uma dificuldade para o uso desta estratégia é a natureza híbrida das carragenanas, que contém diferentes unidades dissacarídicas que podem ser resistentes a ação das enzimas, não produzindo fragmentos equivalentes (CAMPO et al., 2009).

Espectros de ^1H - e ^{13}C -RMN revelam que é raro termos amostras de carragenanas “puras”, sendo comum encontrar unidades de ι em κ -carragenana e vice versa, bem com pequenas porcentagens de unidades de precursores biológicos (VAN DE VELDE et al., 2002). Uy et al. (2005) analisaram carragenanas extraídas de *K. alvarezii* e confirmaram a predominância de κ -carragenana na sua estrutura.

2.6.3 Espalhamento de raios X a baixos ângulos

Métodos de caracterização estrutural que exploram a dispersão de ondas eletromagnéticas, tais como espalhamento de luz e espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), são eficazes para analisar polímeros em solução e géis. A análise de SAXS, em particular pode ser aplicada para a caracterização estrutural de agregações moleculares de cadeias de açúcar ou proteínas em solução em nível nanométrico. O princípio do SAXS baseia-se no fato de que, quando um feixe de luz incide sobre uma solução ou suspensão aquosa observa-se o

espalhamento de fótons deste feixe para direções (ângulos θ) diferentes da direção do feixe incidente ($\theta = 0$). A intensidade de luz espalhada I tem dependência angular e é uma função: do número de espécies espalhadoras presentes na amostra, da morfologia destas espécies, da concentração e da natureza química das mesmas, além da dependência com a viscosidade, índice de refração e polaridade do solvente. Com isso, é possível se obter informações importantes sobre o sistema apenas medindo $I(q)$ e $I(q, t)$. A variável q é o vetor de onda que expressa a dependência angular como:

$$\left| \vec{q} \right| = q = \frac{4\pi \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda} \quad (\text{Equação 1})$$

onde θ é o ângulo de espalhamento e λ é o comprimento de onda da luz laser.

No espalhamento de luz estático (SLS) mede-se apenas a dependência angular da intensidade de espalhamento de luz, $I(q)$, sem levar em conta as flutuações da intensidade. Na prática, conta-se o número de fótons que chegam a um detector posicionado em cada ângulo θ em um determinado intervalo de tempo e obtém-se, então, $I(q)$ para a amostra. A curva $I(q)$ pode fornecer diversas informações sobre o sistema, de acordo com o formalismo teórico ou aproximação utilizada para interpretação desta. Neste trabalho as curvas foram interpretadas com a aproximação de Guinier (SCHARTL, 2007), onde a intensidade da curva é expressa em função da Equação 2.

$$\ln I = \ln I_0 - q^2 \left(\frac{Rg^2}{3} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

De acordo com a aproximação, é possível se obter o raio de giração R_g a partir do coeficiente angular da seção linear das curvas no limite ($q \rightarrow 0$). O espalhamento de luz dinâmico DLS acessa o movimento Browniano e o relaciona com o tamanho das partículas. Isso é realizado através da incidência de um laser sobre a amostra e análise da flutuação da intensidade de luz espalhada. Devido ao movimento Browniano, a intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre flutuações ao longo do tempo. A relação entre a intensidade I de luz espalhada no ângulo q , no tempo t e no tempo $(t + \tau)$, onde τ é uma correlação do tempo, é expressa em uma curva de autocorrelação g_2 , tal como a da Equação 3.

$$g_2(q, \tau) = \frac{\langle I(q, t) I(q, t + \tau) \rangle}{\langle I(q, t)^2 \rangle} \quad (\text{Equação 3})$$

Para sistemas monodispersos, a função $g(q, \tau)$ tem um único decaimento exponencial com taxa $\Gamma D_0 q^2$, onde D_0 é o coeficiente de difusão translacional no limite ($q \rightarrow 0$). O estudo da dependência angular do DLS de uma amostra pode fornecer a frequência de relaxação média Γ_{app} para cada ângulo; o coeficiente angular do gráfico de Γ_{app} vs. q^2 fornece, então, o coeficiente de difusão translacional D_0 . A relação entre o raio hidrodinâmico (R_H) de uma partícula e D_0 é definida pela Equação de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_0} \quad (\text{Equação 4})$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente (SCHARTL, 2007).

Com base em estudos com SAXS, foi demonstrado que uma solução de 3 % de κ -carragenana com cátion de potássio como contra íon resultam em géis pela formação inicial de duplas hélices e subsequentemente ocorre a associação destas duplas hélices. Ao contrário, a associação de ι -carragenana foi devida somente a formação de duplas hélices (YUGUCHI, 2009). Thành et al. (2002) examinaram características moleculares da família das carragenanas, incluindo as naturais (κ , ι e λ) e as modificadas quimicamente (β e θ), preparadas através da dessulfatação de κ e λ carragenanas, respectivamente) em solução aquosa por espalhamento de luz e de raios-X a baixos ângulos a fim de elucidar os efeitos dos grupos sulfato e dos resíduos de anidrogactose sob as características conformacionais das carragenanas. Foi concluído que a formação da cadeia helicoidal da carragenana requer dois fatores: a inclusão da ligação anidro em (1-4)- α -D-galactose e os grupos sulfatos, especialmente na posição C4 de (1-3)- β -D-galactose. A diferença na capacidade de gelificação pode ser devido à posição dos grupos sulfato (ao invés do número de grupos sulfato por unidade de repetição) e a inclusão de resíduos anidro, visto que carragenanas θ e β , que contém menos anidro e/ou substituintes de sulfato, mostraram menor tendência a formação de gel. Além disso, é relatado que o grupo sulfato na posição C2 de (1-3) β -D-galactose evita a formação de hélices na cadeia de carragenana (presentes nas carragenanas θ , λ e ι). O resíduo de (1-4)- α -D-galactose hidratado tende a quebrar a conformação helicoidal e a falta de grupos sulfato tende a

estender a conformação da cadeia. Sais metálicos promovem a formação da conformação helicoidal provavelmente através da ligação a locais específicos, por isso a capacidade de gelificação depende da posição dos grupos sulfato.

2.6.4 Cromatografia de permeação em gel

Cromatografia de permeação em gel (CPG) tem sido utilizada ao longo de vários anos para caracterizar biopolímeros (VIEBKE; WILLIAMS, 2000). Nesta técnica utilizam-se colunas cromatográficas contendo um gel específico para filtração, que separa os componentes das amostras através de peneiras moleculares, baseando-se em seus tamanhos e configurações geométricas. Deste modo podem-se obter, por meio de permeações, várias frações de polissacarídeos para posterior caracterização (SILVA; CABELLO; PEREIRA, 2005). Collins, Braga e Bonato (1990) descrevem que as moléculas pequenas percorrem pelo interior dos poros do gel e permeiam para a base da coluna, enquanto as moléculas maiores contornam as partículas do gel e caminham mais rapidamente para a base da coluna eluindo antes das moléculas menores.

Através da cromatografia de permeação em gel é possível determinar as massas molares numérica (M_n), ponderal (M_w), o índice de polidispersão (IP) entre outras características moleculares (MYSLABODSKI, STANCIOFF; HECKERT, 1996). Completar as análises da estrutura primária dos polissacarídeos é importante para determinar o número dos açúcares constituintes ou unidades repetidas, ou seja, a média do seu peso molecular ($\langle M_w \rangle$), e a distribuição das moléculas (polidispersidade, $\langle M_w \rangle / \langle M_n \rangle$) (LAHAYE, 2001).

2.6.5 Calorimetria exploratória diferencial

Calorimetria exploratória diferencial (DSC) de fluxo de calor é uma técnica de análise térmica na qual a diferença de temperatura entre uma amostra e o material de referência (termicamente inerte) é medida enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. No DSC de fluxo de calor, amostra e referência são colocadas em cápsulas idênticas, posicionadas sobre um disco termoeletrico e aquecidas por uma única fonte de calor. O calor é

transferido para as cápsulas de amostra e referência por meio do disco, com fluxo de calor diferencial entre ambas as cápsulas sendo controlado por meio de termopares conectados ao disco, uma vez que ΔT (diferença de temperatura), em um dado momento, é proporcional à variação de entalpia, à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo calórico (MACHADO; MATOS, 2004). Ou seja, em um experimento de DSC mede-se a variação de entalpia que ocorre entre a amostra e a referência durante o processo de aquecimento/resfriamento.

Para uma condição de fluxo de calor em estado estacionário, o sinal medido ΔT (entre amostra e referência) é proporcional à diferença nos fluxos de calor ($\Delta\phi$) entre a amostra e a referência.

$$\Delta\phi = -\kappa \Delta T \quad (\text{Equação 5})$$

Um processo endotérmico na amostra, cria um $\Delta T < 0$ e $\Delta\phi > 0$, ou seja, flui calor do disco para a amostra. O contrário ocorre para um processo exotérmico. A constante κ deve ser determinada por calibração, usando padrões com uma constante física conhecida, por exemplo, entalpia de fusão (BERNAL et al., 2002). O calor de fusão pode ser determinado pela área contida sob o pico endotérmico, relacionando-a com a massa de amostra utilizada.

Estudos realizados mostraram que géis de carragenana (1 e 2 % m/m) demonstram transição endotérmica, gel-sol, referente ao aquecimento em temperaturas entre 42 e 53 °C e transição exotérmica, sol-gel, referente ao resfriamento em temperaturas entre 28 e 37 °C (IIJIMA et al., 2007; TOMSIC, PROSSNIGG, GLATTER, 2008). Segundo Iijima et al. (2007), a concentração do gel interfere nas temperaturas de transição e na amplitude dos picos. Misturas de carragenana κ e ι , alternativamente, possuem dois picos. As posições dos picos coincidem com o constituinte dos componentes individuais (κ ou ι) (RIDOUT et al., 1996; VAN DE VELDE et al., 2005). Comparada a κ -carragenana, ι -carragenana possui mais grupos sulfato por unidade de monômero, que dificultam a extensiva agregação de duplas hélices. Por isso, o grau de agregação em géis de ι -carragenana é menor que em géis de κ -carragenana (WANG et al., 2005).

2.6.6 Análise térmica dinâmico-mecânica

A análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA) é usada como uma técnica de caracterização de polímeros através da detecção dos

processos de relaxação, tanto macroscópico quanto molecular, sendo que apresenta sensibilidade superior quando comparada a outras técnicas convencionais de análises térmicas. Essa técnica fornece informações a respeito do módulo elástico (E'), do módulo de dissipação viscosa (E'') e do amortecimento ou atrito interno ($\tan\delta = E''/E'$) de um material quando sujeito a uma solitação dinâmica. Outra aplicação do DMTA é na determinação da temperatura de transições relacionadas a relaxação de grupos ou partes de grupos laterais da cadeia polimérica e , também, a temperatura de fusão cristalina de polímeros semi-cristalinos. Essas temperaturas de transição podem ser definidas através de máximos nas curvas do amortecimento mecânico ($\tan\delta$) como uma função da temperatura (CANEVAROLO, 2004).

As propriedades reológicas das carragenanas vêm sendo extensivamente estudadas usando técnicas de compressão (CHEN; LIAO; DUNSTAN, 2002; NÚÑEZ-SANTIAGO; TECANTE, 2007; HILLIOU; GONÇALVES, 2007). Estas investigações avaliaram os efeitos da concentração, adição de sais e temperatura sobre as propriedades mecânicas dos géis formados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras das algas *Kappaphycus alvarezii*, linhagem tetrasporofítica marrom, foram obtidas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), cultivadas em cultivo experimental em Florianópolis (27°50'S 48°25'W) na praia de Sambaqui. As carragenanas utilizadas para comparar com a carragenana nativa (CN), extraída de *K. alvarezii* na condição otimizada foram: (a) carragenana padrão comercial (CC) (tipo I, C1013 contendo predominantemente κ com menor quantidade de λ , adequado para preparação de gel, pureza:) e (b) padrões de carragenana κ (tipo III, C1263, 99% κ -carragenana), ι (tipo V de *Eucheuma spinosa*, C3799, 99% ι -carragenana) e λ (22049, 99% λ -carragenana) foram adquiridas de Sigma Aldrich.

3.2 EXTRAÇÃO AQUOSA DE CARRAGENANA

As algas foram coletadas em 19/03/2009, secas ao ar e protegidas da chuva por quatro dias e secas em estufa (Fanem, modelo 315 SE) a 60 °C por 48 horas antes do início da extração. As algas previamente secas foram lavadas em água corrente para remoção de sais e sujidades. Foram cominuídas, pesadas (10 g) e embebidas em água (800 mL) durante 1 hora. As algas foram, então, trituradas em água com processador de alimentos. A solução foi colocada em banho-maria (variando os parâmetros tempo e temperatura conforme o planejamento estatístico). Faltando 15 min para finalizar o banho-maria foi adicionado Celite (25 g) para auxiliar no processo de filtração. A filtração para separação das carragenanas (filtrado) do resíduo (basicamente celulose) foi realizada em sistema a vácuo com utilização de papel filtro qualitativo. A solução filtrada foi atomizada em Mini Spray-Dryer B-290 (BÜCHI) para obtenção do pó de carragenana, utilizando os parâmetros: temperatura de 200 °C, fluxo de ar de 30 mL/min, 100 % da capacidade do aspirador e 25 % da capacidade da bomba.

O rendimento de carragenana foi calculado utilizando a Equação 6:

$$y_{carragenana} = (P/AS) \cdot 100 \% \quad (\text{Equação 6})$$

Onde $y_{carragenana}$ é o rendimento da carragenana (%), P é a quantidade de carragenana nativa (CN) em gramas e AS é a quantidade de alga (~10 g) utilizada na extração em base seca.

3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi utilizada para determinar a condição ótima para a extração de carragenana de *K. alvarezii*. O planejamento composto central (CCD) com duas variáveis independentes foi empregado. As variáveis utilizadas foram: temperatura e tempo de extração. Os valores mínimo, máximo e médio para o efeito do tempo de extração foram 2,59, 5,41, 4 horas, respectivamente e, em relação à temperatura de extração os valores foram 32, 88 e 60 °C. A escolha dos níveis foi baseada em estudos prévios. O planejamento completo consistiu de 13 experimentos, incluindo quatro fatoriais (níveis -1 e +1), quatro axiais (níveis $\pm\alpha$) e cinco replicatas no ponto central (Tabela 1). Os experimentos no ponto central do planejamento foram realizados para se estimar o erro puro. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória para minimizar o efeito de variações inexplicáveis das respostas, devido a erros sistemáticos. A função resposta (y) medida foi o rendimento, a força do gel e a viscosidade da carragenana extraída.

Tabela 1 - Níveis codificados das duas variáveis empregadas para extração de carragenana no planejamento composto central

Variáveis		Níveis				
		-1,414214	-1	0	1	1,41421
Tempo de Extração (h)	X_2	2,5857864	3	4	5	5,41421
Temperatura de Extração (°C)	X_1	31,715729	40	60	80	88,2843

alfa = +/-1,414 para k=2 (2 variáveis independentes)

3.3.1 Análises estatísticas

Os coeficientes de regressão para termos lineares, quadráticos e a interação entre os termos foram determinados por regressão linear múltipla (MLR). A significância de cada coeficiente de regressão foi

avaliada estatisticamente pelo valor t a partir do erro puro obtido das replicatas no ponto central. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validar o modelo.

Os coeficientes de regressão foram usados para determinar o modelo de 2ª ordem para cada resposta. Este modelo é expresso com variáveis codificadas (temperatura = X_1 , tempo = X_2) através da Equação 7:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{12}X_1X_2 + \varepsilon \quad (\text{Equação 7})$$

Onde Y representa a resposta observada, B_0 representa o termo constante para os parâmetros da equação, B_i representa os termos lineares, B_{ii} representam os termos quadráticos para uma única variável, B_{ij} representam os termos de interação ($i = 1, 2$; e $j = 1, 2$), e ε representa o erro aleatório.

Após o ajuste do modelo de 2ª ordem, as condições de extração ótimas foram obtidas. O gráfico da superfície de resposta foi gerado usando o *software* Statistica 6.0 (2001) (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) (5 % de significância) representando uma função das duas variáveis independentes.

3.4 ANÁLISES PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DA CARRAGENANA NATIVA

3.4.1 Viscosidade

A reologia das soluções de carragenana (1,5 % m/m preparadas a 80 °C) foi medida em um Reômetro *Brookfield RVDV-IIIPLUS* (Brookfield Engineering Laboratories, modelo DVIII Ultra, Stoughton, MA, EUA), com cilindros concêntricos (*spindle* ULA). O reômetro estava equipado com um banho termoestabilizado (TECNAL modelo TE-184, SP, Brasil) para controle da temperatura (75 °C) do ensaio. A obtenção dos dados foi feita no *software* Rheocalc® 32 (versão 2.5, Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro MA 02346 EUA). As curvas de fluxo foram geradas medindo a tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação. Foi utilizado um intervalo de taxa de deformação de 12 s⁻¹ a 95 s⁻¹. As análises foram realizadas em triplicata.

3.4.2 Análise instrumental de textura

As propriedades de textura dos géis de carragenanas comercial e nativa extraída na condição otimizada (1,5 % m/m diluídas a 80 °C) foram realizadas em moldes plásticos cilíndricos de 30 mL com a amostra a 8 ± 2 °C. Uma sonda cilíndrica acrílica com 5 mm de diâmetro com uma penetração de 2 mm no gel de carragenana e a uma velocidade de 2 mm/s foi utilizada na penetração. Foi empregado um texturômetro TA-XT2 (*Stable Micro System, Texture Expert, Surrey, Reino Unido*). Os parâmetros força do gel, consistência e adesividade e força de adesão foram obtidos através do *software Texture Expert for Windows (Stable Micro Systems)*. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

3.5 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CARRAGENANA COMERCIAL E NATIVA

3.5.1 Determinação de sulfato

Os teores de grupos sulfato presentes nos polissacarídeos foram determinados pelo método de Jackson e McCandless (1978), tendo como reagentes a mistura gelatina-bário. A análise inicia-se com a hidrólise total da molécula (HCl 0,5M, 2 h, 105 °C), havendo liberação dos grupamentos sulfato em solução. Em contato com o íon bário, adicionado como BaCl₂, forma-se um composto insolúvel, BaSO₄, que se mantém em suspensão devido à presença da gelatina. O método é turbidimétrico, sendo a leitura realizada em um comprimento de onda de 550 nm, apresentando limite de quantificação de 20 a 200 g de sulfato. O padrão utilizado foi uma solução de sulfato de sódio.

Para preparação do reagente de gelatina (Gelnex) e cloreto de bário foi dissolvida 0,6 g de gelatina em 200 mL de água quente (60-70 °C). A solução foi acondicionada em refrigerador (8 °C) por uma noite. Após cerca de 16 horas, o fluido semigelatinoso foi deixado a temperatura ambiente (25 °C) para proceder a adição de 2,0 g de BaCl₂. 2H₂O grau analítico. A solução foi agitada com o auxílio de barras magnéticas até a completa dissolução do cloreto de bário. O reagente foi armazenado em refrigerador (8 °C). Antes das análises, o reagente foi

mantido a temperatura ambiente (25 °C) por duas horas em constante agitação para garantir homogeneidade.

Anteriormente à análise, todas as vidrarias foram lavadas com uma solução de ácido clorídrico 2 % e enxaguadas com água destilada, para evitar a contaminação por sulfato. Para a construção da curva padrão foram dissolvidos 0,5470 g de sulfato de sódio, seco em estufa a 60 °C por 12 horas, em 100 mL de água destilada. Foram pipetados 100 µL, 250 µL, 500 µL, 750 µL, 1 mL, 1,3 mL, 1,6 mL, 2,0 mL, 3,2 mL e 4,0 mL da solução padrão de sulfato de sódio (~0,5 %) em balões de 25 mL completados com água destilada. Foram pipetados 2 mL da cada solução da curva em 18 mL de água destilada, 2 mL de ácido clorídrico 0,5N, as soluções foram agitadas e foi adicionado 1 mL de reagente gelatina - cloreto de bário. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 550 nm.

Para a hidrólise da carragenana foram pesados 40 mg de carragenana, seca em estufa a 60 °C por 12 horas, e umedecida com 100 µL de álcool etílico 95% e 0,5 mL de ácido clorídrico 0,5N. Esta solução foi posta em banho de água fervente por 2 horas. Depois, o volume foi completado para 10 mL e centrifugado a 11000 rpm por 25 min. Foram pipetados 2 mL do sobrenadante em 18 mL de água destilada, 2 mL de ácido clorídrico 0,5N, as soluções foram agitadas e foi adicionado 1 mL de reagente gelatina - cloreto de bário. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 550 nm.

3.5.2 Determinação de carboidratos totais

O método utilizado baseia-se no método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico para determinação de açúcares conforme metodologia adaptada de Dubois et al. (1956). A solução padrão de galactose foi preparada dissolvendo 0,1 g de galactose p.a. em 100 mL de água destilada. Pipetou-se uma alíquota de 10 mL e o volume foi completado para 100 mL. A curva padrão foi construída a partir desta solução de galactose 0,01 %. Desta solução foram pipetadas alíquotas de 200, 400, 600, 800, 1000, 1500 e 2000 microlitros para tubos de ensaio e o volume foi elevado para 2000 microlitros com água destilada. A seguir adicionou-se 0,05 mL da solução de fenol 80 % e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado seguido de agitação. Depois de 10 minutos em repouso os tubos foram colocados em banho-maria a 30 °C por 15

minutos e a seguir a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

Foram preparadas soluções de carragenana 0,1% e desta foram pipetados 10 mL em um balão volumétrico de 100 mL, obtendo-se uma solução de 0,01%. Foram pipetados 2 mL de cada solução de carragenana em um tubo de ensaio e foi adicionado 0,05 mL da solução de fenol 80% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e agitou-se. Depois de 10 minutos em repouso os tubos foram colocados em banho-maria a 30 °C por 15 min e a seguir a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

3.5.3 Determinação de minerais

3.5.3.1 Determinação de fosfato

A determinação de fosfato foi realizada de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Para construção da curva padrão foram pesados 0,9587 g de fosfato de potássio dissolvidos em água deionizada e aferidos para 500 mL. A partir desta solução, foram pipetados 50 mL e então transferidos para balão volumétrico e posteriormente aferidos para 250 mL. Obteve-se uma solução com concentração de 0,2 mg P_2O_5 /mL. Desta pipetou-se os volumes (0,1,2,3,4,6,8,10 mL) para balão volumétrico de 100 mL contendo 25 mL de vanado-molibdato de amônio, sendo o volume completado com água. Depois de 10 min a 20 °C foi realizada leitura em espectrofotômetro a 42 nm.

As cinzas obtidas de 5 g da amostra foram dissolvidas em ácido clorídrico (1+2), e transferidas para um balão volumétrico de 100 mL completando o volume com água. Foi pipetada uma alíquota proporcional a quantidade de fosfato na amostra em um balão volumétrico de 100 mL. Foram adicionados 25 mL do reagente de vanado-molibdato de amônio e o volume foi completado para 100 mL. As amostras foram homogeneizadas e após 10 min. foi feita leitura em espectrofotômetro a 420 nm.

3.5.3.2 Determinação de cálcio

A determinação de cálcio foi realizada através do Método Oficial da AOAC 944.03 – método titrimétrico (AOAC 2005).

3.5.3.3 Determinação de ferro

A determinação de ferro foi realizada conforme a metodologia oficial da AOAC 944.02 – método espectrofotométrico. Para a construção da curva padrão foram pesados 3,5104 g de sulfato ferroso amoniacal dissolvidos em água deionizada e avolumados para 500 mL. A partir desta solução, foram pipetados 10 mL e então transferidos para balão volumétrico de 1000 mL. Obteve-se uma solução com concentração de 0,01 mg/mL de ferro. Desta foram pipetados os volumes 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 mL para balão volumétrico de 100 mL. Foram pipetados 10 mL de cada solução para balão volumétrico de 25 mL para proceder a reação (AOAC 2005).

3.5.3.4 Determinação de sódio e potássio

A determinação de sódio e potássio foi realizada conforme a metodologia oficial da AOAC 969.23 – método de fotometria de chama (AOAC 2005).

3.5.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As análises no infravermelho (FTIR) foram realizadas em um equipamento Perkin Elmer, modelo 16PC, com resolução 4 cm^{-1} , na faixa de 4000 – 400 cm^{-1} . Os espectros foram obtidos em pastilhas de KBr (grau espectrométrico).

3.5.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em espectrômetro Varian Mercury Plus a 400 MHz para hidrogênio (RMN ^1H). As amostras foram preparadas em soluções a 3 % (m/m) em D_2O .

3.5.6 Espalhamento de raios X a baixos ângulos

As medidas de espalhamento de raios-X a baixos ângulos foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS, Campinas. Os experimentos foram feitos selecionando o comprimento de onda dos fótons $\lambda = 1,76 \text{ \AA}$ e a distância do detector $d = 2,5079 \text{ m}$ da amostra. Estas condições impõem um limite angular de $0,05 < 2\theta < 1,15$. A detecção foi feita com uma câmera CCD. As amostras (1,5 % m/m) foram preparadas sob aquecimento de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e, após, foram termostatizadas durante todas as medidas, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. A aquisição era sempre feita com dois quadros (difratogramas) de 150 s cada, exceto quando o tempo foi ajustado em função do espalhamento da amostra. As amostras líquidas (emulsões) foram injetadas em um porta-amostra com janela de mica. As amostras sólidas foram presas a um conjunto de aros metálicos por fita Kapton e estes aros foram então inseridos no lugar da janela de mica do porta-amostra anterior e vedados com aros de PTFE.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DO GEL E DA CARRAGENANA EM SOLUÇÃO

3.6.1 Determinação da massa molar por cromatografia de permeação em gel

As análises da amostra da carragenana nativa extraída na condição otimizada empregando cromatografia de permeação em gel (CPG) foram realizadas em um TDA 302 – Triple Detector Array (detectores de Índice de Refração, Viscosímetro e Espalhamento de Luz) da Viscotek®.

A amostra foi diluída em tampão fosfato de sódio 70 mM pH 7,0 à uma concentração final de aproximadamente 2,72 mg/mL e submetidas a aquecimento (40 °C) por aproximadamente 10 minutos. Após resfriamento, as amostras foram homogeneizadas e filtradas em filtro Millipore® PVDF 0,45 µm e transferidas para *vial* de 2 mL a ser posicionado no *rack* do injetor automático. Foram efetuadas duas corridas de cada amostra para confirmação da reprodutibilidade das medidas. Foi utilizada como fase móvel solução tampão de fosfato de sódio 70 mM pH 7,0 filtrado a vácuo e degaseificado com membrana 0,45 µm. Foi utilizada a coluna 3 x PolyAnalytik PAA 206M Aqua000125 (30cm x 8mm) – Limite de Exclusão 2×10^7 . A temperatura de coluna foi de 30 °C, a temperatura dos detectores de 30 °C e o fluxo bombeado de 1mL/minuto. O volume de injeção utilizado foi de 100 µL e o tempo de corrida foi estabelecido em 55 minutos. Os detectores (Índice de Refração, Viscosímetro Capilar e *Light Scattering* duplo ângulo RALS e LALS RALS e DP) foram calibrados com padrão PEO 22K em NaNO₃ (2,04 mg/mL). Os cromatogramas obtidos foram analisados com o Software de Processamento de Dados OMNISec, utilizando-se dn/dc (incremento do índice de refração) igual a 0,145.

3.6.2 Teste de relaxação

O teste de relaxação das carragenanas comercial e extraída de *K. alvarezii* na condição otimizada foram realizados medindo-se a queda da força de reação do gel durante uma compressão constante de 20 segundos utilizando um texturômetro TA-XT2 (*Stable Micro System, Texture Expert, Surrey, Reino Unido*). As soluções de carragenana a 3% (m/m) foram preparadas a 80 °C, dispersas em formas cilíndricas medindo 3 cm de diâmetro e 1 cm de altura e resfriadas a aproximadamente 8°C. Uma sonda cilíndrica com área superficial de 19,63 cm² comprimiu a amostra a uma velocidade de 0,5 mm/s até deformação de 50 % da altura da amostra. As análises foram realizadas em triplicata.

A razão de relaxação a 20 segundos foi determinada pela Equação 8 (PELEG, 1979):

$$R_{RELAX} = \frac{F(t)}{F_0} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde F_0 é a força em $t=0$ e $F(t)$ é a força em $t=20s$.

Os resultados dos testes de relaxação foram normalizados e analisados através do modelo empírico proposto por Peleg (1979; 1980) para materiais biológicos sólidos demonstrado na Equação 9 (PELEG, 1979; 1980; MÜLLER; LAURINDO; YAMASHITA, 2009; FRITZEN-FREIRE et al., 2010), onde $F(t)$ é a força instantânea durante o tempo de relaxação e F_0 é a força máxima inicial.

$$\frac{F(t)}{F_0} = 1 - \frac{c_1 t}{c_2 + t} \quad (\text{Equação 9})$$

Os parâmetros c_1 e c_2 foram estimados por regressão não-linear usando o *software* STATISTICA versão 6.0 (STATSOFT INC., 2001). Neste modelo, $1-c_1$ e c_1/c_2 fornecem informações sobre as características viscoelásticas do material. O valor de $1-c_1$ pode ser visto como o “grau de solidez”, enquanto a razão de c_1/c_2 representa a taxa inicial de decaimento da força. Como o grau de solidez está associado ao comportamento global do material, foram levados em consideração todos os dados experimentais. Para se obter uma estimativa precisa da taxa inicial de decaimento, os dados foram ajustados utilizando os cento e cinquenta primeiros pontos experimentais das curvas de relaxação, adimensionalmente através da razão $F(t)/F_0$ versus o tempo, como sugerem Müller, Laurindo e Yamashita (2009) e Fritzen-Freire et al. (2010).

3.6.3 Calorimetria exploratória diferencial

As temperaturas de gelificação e fusão do gel foram medidas por calorimetria exploratória diferencial (DSC). As análises foram realizadas com um aparelho DSC50-Shimadzu utilizando aproximadamente 20 mg de um gel (1,5% m/m) previamente equilibrado durante 24 horas em placas de alumínio para DSC. Foi utilizada uma atmosfera inerte de nitrogênio a um fluxo de 25 mL por minuto, com uma taxa de aquecimento de 5°C/ min., uma placa com água destilada foi utilizada como referência.

3.6.4 Análise térmica dinâmico mecânica

Para a análise térmica dinâmico mecânica foram preparadas soluções de carragenana (comercial e nativa) a 3 % (m/m) diluídas a 80

°C. Estas soluções foram dispostas em moldes de formato cilíndrico, com diâmetro de 11 mm e altura de 2,5 mm. Em seguida foram refrigeradas a 10 °C.

Esta análise foi realizada no Laboratório de Polímeros do Professor Dr. Ricardo Oliveira no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O equipamento utilizado foi um DMA Q 800 da TA Instruments. Os experimentos foram realizados dentro da região viscoelástica linear (0,1 % de deformação) utilizando uma geometria de compressão.

Foram realizados dois tipos de ensaios, o primeiro variando a temperatura de -10 °C a 80 °C a frequência constante, para avaliar a fusão do gel. E, no segundo foi feita uma varredura de frequência de 0,1 Hz até 100 Hz, a temperatura constante de 10 °C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DA CARRAGENANA

Através da Metodologia de Superfície de Resposta foram obtidos os parâmetros ótimos quanto ao tempo e a temperatura de extração. Os valores experimentais das respostas avaliadas para rendimento, força do gel e viscosidade obtidos nos pontos do planejamento composto central estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados do rendimento, da força do gel e da viscosidade da carragenana de *Kappaphycus alvarezii* baseados no tempo e na temperatura de extração

Experimento	Variáveis Reais		Variáveis Escalonadas		Respostas		
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	X ₁	X ₂	Rendimento (%)	Força do Gel (g/cm ²)	Viscosidade (cP)
1	40	3	-1	-1	22	36,80	10,28
2	80	3	1	-1	35	128,05	21,99
3	40	5	-1	1	18	47,26	9,11
4	80	5	1	1	34	115,11	22,23
5	32	4	-1,41	0	19	18,33	3,02
6	88	4	1,41	0	32	130,39	17,73
7	60	2,59	0	-1,41	26	126,29	21,46
8	60	5,41	0	1,41	27	131,36	37,78
9	60	4	0	0	27	158,31	31,96
10	60	4	0	0	25	135,96	26,10
11	60	4	0	0	34	168,86	45,91
12	60	4	0	0	23	134,66	40,83
13	60	4	0	0	27	147,14	26,26

A significância de cada coeficiente de regressão foi julgada estatisticamente computando o valor t do erro puro obtido das replicatas no ponto central. Para compor o modelo foram utilizados os coeficientes de regressão múltipla para as variáveis independentes significativas para o teste t ($p \leq 0,05$). Os coeficientes de regressão múltipla estão mostrados na Tabela 3.

A variável tempo de extração não apresentou influência ($p > 0,05$) nas respostas de rendimento da extração (Y_1) e de viscosidade da solução (Y_3), portanto, os coeficientes de regressão múltipla relativos a esta variável independente não foram utilizados na construção das equações que representam os modelos para estas duas respostas. Sendo

que, para rendimento da extração foi observado somente o efeito linear da temperatura. Para a viscosidade da solução foi observado o efeito quadrático da temperatura. Tanto o tempo como a temperatura de extração influenciaram ($p < 0,05$) a força do gel (Y_2). A interação entre as variáveis independentes não foi significativa para nenhuma das respostas observadas (Tabela 3).

Através dos coeficientes significativos para o teste t ($p \leq 0,05$) foram desenvolvidas as equações do modelo de superfície de resposta, mostradas na Tabela 4.

Os coeficientes de determinação (R^2) para Y_1 , Y_2 e Y_3 foram 0,74, 0,94 e 0,71, respectivamente, indicando uma boa qualidade de ajuste dos modelos. Uma representação gráfica da qualidade dos modelos pode ser vista nas Figuras 4a e b, 5a e b, 6a e b. Os valores preditos (\hat{y}) em relação valores experimentais (y) encontrados mostraram que os modelos se adaptam bem aos dados (Figuras 4a, 5a e 6a). Os gráficos dos resíduos ($y - \hat{y}$) mostraram valores baixos e não existe nenhum ponto considerado como valor discrepante (Figuras 4b, 5b e 6b), com exceção do ponto que representa o experimento 11 na Figura 4b, relativa ao rendimento da extração. Através destes dados pode-se assumir que os modelos estão bem ajustados e que a suposição de aleatoriedade dos resíduos foi satisfeita.

Tabela 3 - Coeficientes de regressão, erro padrão e valores p para o modelo de extração natural da carragenana de *K. alvarezii*

	Rendimento da extração				Força do gel			Viscosidade		
	Erro			p	Erro			Erro		
	Coefficiente	padrão	t		Coefficiente	padrão	t	Coefficiente	padrão	t
B ₀	27,19 ^a	1,61	16,91	0,000001	149,09 ^a	6,72	22,18	34,23 ^a	3,46	9,91
B ₁ X ₁	5,96 ^a	1,28	4,66	0,002307	39,90 ^a	5,34	7,47	5,74 ^a	2,75	2,09
B ₁₁ X ₁ ²	-0,54	1,38	-0,39	0,709131	-43,00 ^a	5,79	-7,43	-13,16 ^a	2,97	-4,43
B ₂ X ₂	-0,45	1,27	-0,35	0,734202	0,59	5,32	0,11	2,77	2,74	1,01
B ₂₂ X ₂ ²	-0,03	1,37	-0,02	0,982095	-14,93 ^a	5,72	-2,61	-3,28	2,94	-1,11
B ₁₂ X ₁ X ₂	0,75	1,80	0,42	0,689164	-5,85	7,52	-0,78	0,35	3,86	0,09

^a Nível significativo para o teste-F: 0,05, graus de liberdade: 5

X₁ = temperatura; X₂ = tempo

Tabela 4 - Modelo de superfície de resposta para carragenana extraída de *K. alvarezii*

Resposta	Modelo polinomial quadrático	R ²
	Variáveis reais	Variáveis escalonadas
Rendimento da extração	$Y_1 = 8,97 + 0,3 X_1$	$Y_1 = 27,19 + 5,96 X_1$
Força do gel	$Y_2 = -598,75 + 14,89 X_1 - 0,107 X_1^2 + 120 X_2 - 14,93 X_2^2$	$Y_2 = 149,09 + 39,90 X_1 - 42,99 X_1^2 + 0,58 X_2 - 14,93 X_2^2$
Viscosidade	$Y_3 = -99,96 + 4,11 X_1 - 0,0319 X_1^2$	$Y_3 = 34,23 + 5,73 X_1 - 13,16 X_1^2$

Y₁ (rendimento da extração, %), Y₂ (força do gel, g/cm²), Y₃ (viscosidade, cP), X₁ (temperatura), X₂ (tempo)

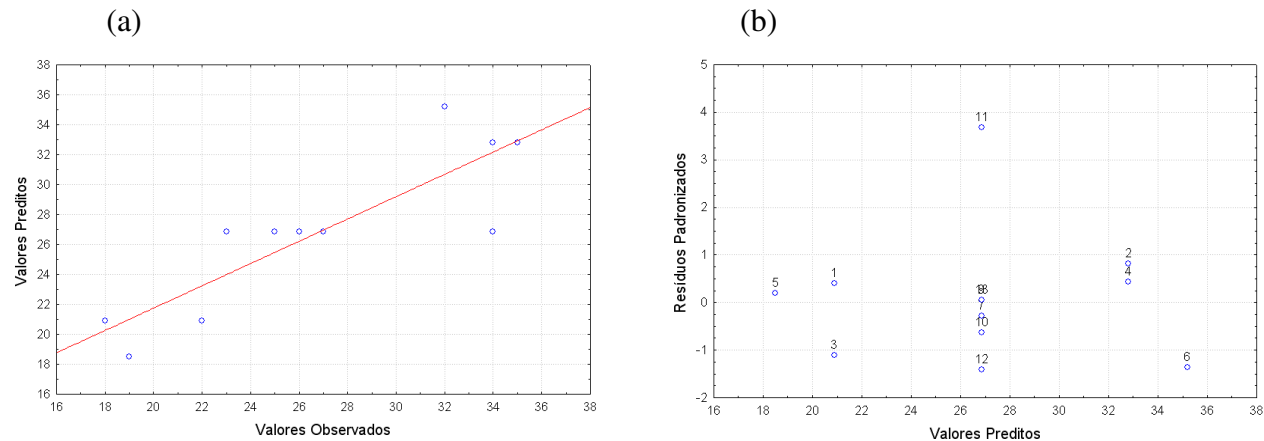


Figura 4 - Rendimento da extração em carragenana de *K. alvarezii* (a) Valores preditos pelos observados (b) Resíduos pelos valores preditos

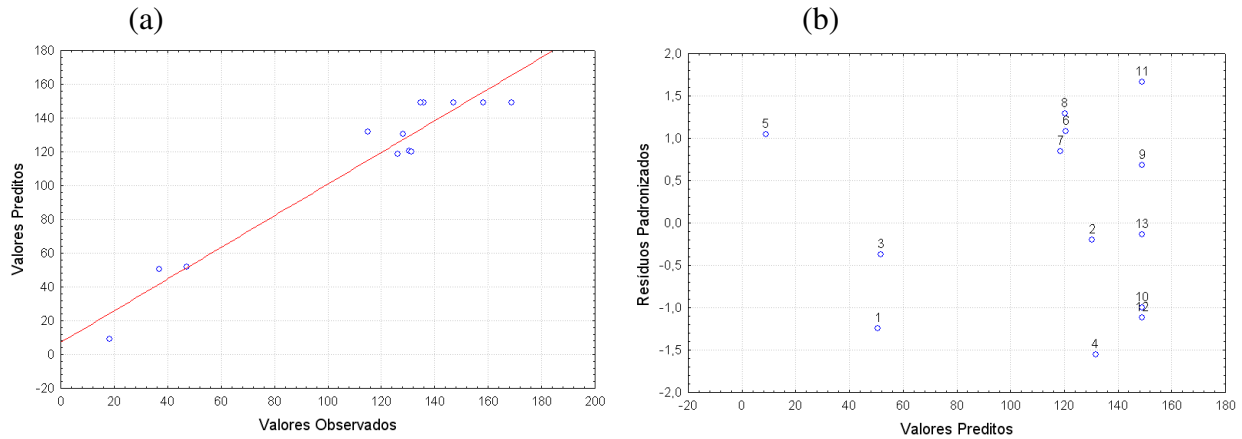


Figura 5 - Força do gel da carragenana de *K. alvarezii* (a) Valores preditos pelos observados (b) Resíduos pelos valores preditos

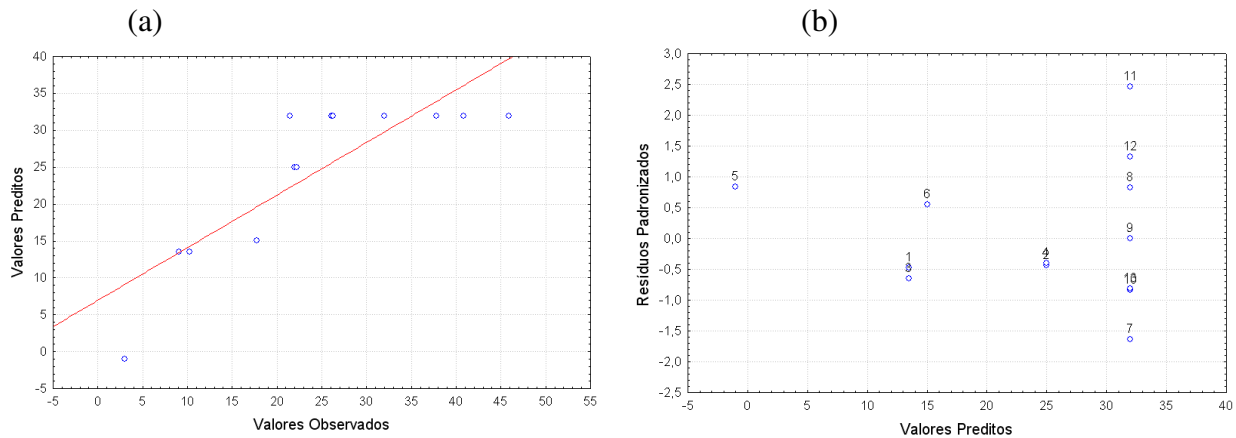


Figura 6 - Viscosidade da carragenana de *K. alvarezii*. (a) Valores preditos pelos observados (b) Resíduos pelos valores preditos

4.1.1 Análise de variância

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas para avaliar a significância da equação do modelo polinomial quadrático (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de variância para o modelo de superfície de resposta do rendimento da extração, força do gel e viscosidade da carragenana extraída de *K. alvarezii*

Rendimento da extração						
Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F_{Calc}	p -valor	
Regressão*	287,12	5	57,42	4,4	3,85E-02	
Resíduos	90,57	7	12,94			
Falta de ajuste	21,77	3	7,26	0,42	0,747857	
Erro Puro	68,80	4	17,20			
Total	377,69	12				
Força do gel						
Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F_{Calc}	p -valor	
Regressão*	26768,81	5	5353,76	23,7	2,98E-04	
Resíduos	1582,04	7	226,01			
Falta de ajuste	721,76	3	240,59	1,12	0,440502	
Erro Puro	860,28	4	215,07			
Total	27466,47	12				
Viscosidade						
Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F_{Calc}	p -valor	
Regressão*	1564,69	5	312,92	4,9	3,10E-02	
Resíduos	451,57	7	64,51			
Falta de ajuste	103,47	3	34,49	0,40	0,763500	
Erro Puro	348,10	4	87,03			
Total	1958,63	12				

* Significativo para nível de significância de 0,05

A regressão foi significativa para todas as respostas e a falta de ajuste não foi significativa. Portanto os três modelos explicam adequadamente a variação das respostas.

As Figuras 7, 8 e 9 ilustraram a função resposta estimada e os efeitos das variáveis independentes (temperatura e tempo) sobre as variáveis dependentes (rendimento da extração, força do gel e viscosidade). O rendimento da extração aumenta linearmente com o aumento da temperatura de extração (Figura 7). Na condição satisfatória

de 74 °C por 4 horas o rendimento calculado pelo modelo dado é de 31,17 % e o rendimento obtido experimentalmente foi $35,8 \pm 4,68$ %.

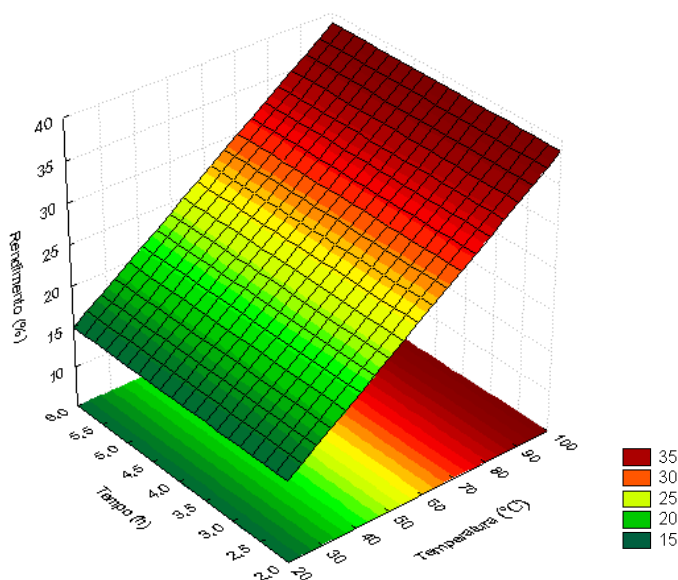


Figura 7 - Superfície de Resposta mostrando o efeito da temperatura e tempo de extração sobre o rendimento na extração de carragenana de *K. alvarezii*

O efeito das variáveis independentes sobre a força do gel é mostrado na Figura 8. Os fatores temperatura e tempo de extração tiveram influência sobre a força do gel. A força do gel é maior quando a carragenana é extraída de *K. alvarezii* a temperatura de 74 °C por 4 horas (Figura 8). Em temperaturas maiores pode ter ocorrido degradação do biopolímero. Na condição satisfatória de 74 °C por 4 horas a força do gel calculada pelo modelo dado é de $158,27 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$ e a força do gel obtida experimentalmente foi $112,50 \pm 4,959 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-2}$.

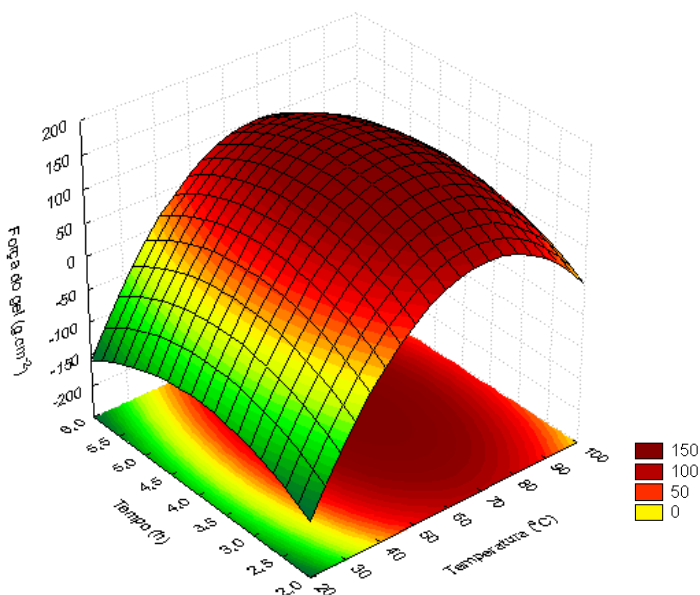


Figura 8 - Superfície de Resposta mostrando o efeito da temperatura e tempo de extração sobre a força do gel de carragenana de *K. alvarezii*

O efeito das variáveis independentes (tempo e temperatura de extração) sobre a viscosidade da solução de carragenana de *K. alvarezii* é mostrado na Figura 9. A viscosidade foi maior em temperatura de aproximadamente 60 °C, sendo que em temperaturas maiores que esta a viscosidade decresce. O tempo de extração não influenciou viscosidade da solução de carragenana. Na condição satisfatória de 74 °C a viscosidade calculada pelo modelo adequado é de 29,5 cP e a viscosidade obtida experimentalmente da carragenana obtida da extração a 74 °C por 4 horas foi $16,01 \pm 1,025$ cP.

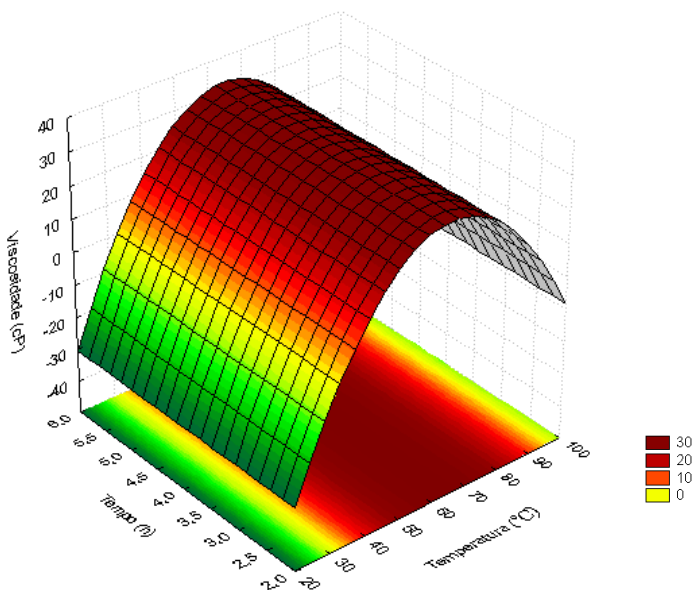


Figura 9 - Superfície de Resposta mostrando o efeito da temperatura e tempo de extração sobre a viscosidade da solução de carragenana de *K. alvarezii* (1,5 % p/p) a 75 °C

Comparando os resultados obtidos com trabalhos anteriores, o rendimento da extração, que variou de 18 a 35 %, se aproxima dos dados obtidos por Hayashi et al. (2007b) (21 a 35 %) que também utilizou a extração natural de carragenana de *K. alvarezii*, porém não utilizou a secagem por atomização, e sim precipitação em álcool seguida de secagem em estufa. Muñoz, Freile-Pelegrín e Robledo (2004) encontraram um rendimento de aproximadamente 37% em carragenana para alga *K. alvarezii* utilizando extração em água quente, na qual após a filtração a solução foi ajustada a pH 8,5-8,6 com solução de NaOH 0,3N e o filtrado foi precipitado com a utilização de brometo de hexadecil-trimetil-amônia (*hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide* (CTAB) e acetona 9:1, depois disso, a carragenana recuperada foi lavada com acetato de sódio e com etanol 95 % e, por fim a carragenana resultante foi seca em estufa a 60 °C por 24 horas.

Os dados da força do gel variaram de 18,33 a 168,86 g cm⁻². Estes resultados foram menores do que os encontrados por Hayashi et al. (2007b) que utilizaram géis preparados em soluções salinas, o que induz a formação de gel de carragenana (NILSSON; PICULELL, 1991;

VIEBKE; PICULELL; NILSSON, 1994; DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Porém, os resultados do presente trabalho foram maiores do que os encontrados por Freile-Peigrín, Robledo e Azamar (2006) e Freile-Peigrín e Robledo (2008) os quais utilizaram extração alcalina e, assim como no presente estudo, nenhum sal na preparação das amostras, e obtiveram géis de carragenana fracos ($< 50 \text{ g cm}^{-2}$) de carragenana de *Eucheuma isiforme* (alga produtora principalmente de carragenana 1) de diferentes regiões.

A viscosidade variou muito (3,02 a 45,91 cP) conforme a temperatura utilizada na extração. Os valores obtidos no ponto central foram próximos dos obtidos por Freile-Peigrín, Robledo e Azamar (2006) da extração natural de *Eucheuma isiforme* cultivadas no México (39 a 57 cP), porém foram significativamente menores do que os encontrados por Freile-Peigrín e Robledo (2008) ($144,6 \pm 3,3$ cP) em carragenanas de *Eucheuma isiforme* cultivadas em Nicarágua e extraídas também sem tratamento alcalino. Hurtado (1995) obteve valores semelhantes (23 a 34,5 cP) para carragenana de *K. alvarezii*, já Muñoz, Freile-Peigrín e Robledo (2004) encontraram valores muito maiores (122,2 a 147,2 cP) utilizando também *K. alvarezii* com os mesmos parâmetros de análise (1,5 % m/m e 75 °C).

Dados coletados sobre carragenana extraída da mesma alga utilizada neste trabalho (ou seja, *K. alvarezii* cultivada na ilha Florianópolis – SC), porém com tratamento alcalino, precipitação alcoólica e gelificados com a adição de sal de potássio mostram um rendimento de $35,32 \pm 1,08$, força do gel de $486,09 \pm 204,39 \text{ g/cm}^2$ e viscosidade da solução de 58,82 cP (a 1,5 % m/m e 75 °C) (SOUZA, 2009). Estes resultados foram próximos aos obtidos no presente trabalho e as diferenças obtidas, principalmente quanto a força do gel, podem ser devido à adição de KCl que auxilia na aproximação das cadeias e consequentemente na formação de hélices e na obtenção de um gel mais rígido.

As propriedades da carragenana podem variar extensamente dependendo da época de colheita (sazonalidade) (AZANZA-CORRALES; SA-A, 1990; TRONO; LLUISMA, 1992) da região e das condições de cultivo (salinidade, profundidade, nutrientes disponíveis), do tempo de cultivo (HAYASHI et al., 2007b), e também dependendo do processo e dos parâmetros escolhidos para extração (HILLIOU et al., 2006; MONTOLALU et al., 2008).

4.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química das carragenanas comercial e nativa, extraída na condição otimizada de *K. alvarezii*, está descrita na Tabela 6.

Tabela 6 - Composição química das carragenanas comercial e nativa

Componentes (g/100g)	Carragenana			
	Comercial		Nativa	
Carboidratos Totais	64,82 ^a ± 4,03758		56,44 ^a ± 3,13955	
Éster Sulfato	21,65 ^a ± 1,19709		20,02 ^a ± 0,54000	
Umidade	2,50 ^a ± 0,05749		2,89 ^a ± 0,41189	
Resíduo Mineral Fixo	31,38 ^a ± 0,09074		32,46 ^b ± 0,29939	
Ferro	0,00849 ^b ± 0,00045		0,00507 ^a ± 0,00027	
Fósforo	0,01637 ^a ± 0,00105		0,09728 ^b ± 0,00299	
Cálcio	1,77837 ^b ± 0,02655		0,15074 ^a ± 0,01656	
Potássio	11,1985 ^a ± 0,17296		11,2165 ^a ± 0,22767	
Sódio	0,47186 ^a ± 0,00827		3,01669 ^b ± 0,14834	

^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças ($p < 0,05$) entre as diferentes carragenanas estudadas.

Estevez, Ciancia e Cerezo (2004) encontraram um valor de 54 % de conteúdo de carboidratos totais para κ -carragenana comercial (sigma-c1263) purificada por reprecipitação em 0,125 M KCl e por diálise, e um valor de 45 %, para carragenana extraída de *K. alvarezii* com tratamento alcalino, purificada por reprecipitação e diálise, respectivamente.

O conteúdo de grupos sulfato está de acordo com o valor esperado para κ -carragenana que é de aproximadamente 20 % (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Villanueva, Hilliou e Sousa-Pinto (2009) encontraram valores entre 20,7 e 22,2 % (m/m) de sulfato para carragenana extraída de *Chondrus crispus* (produtora de carragenana híbrida κ/ι) sujeita a diferentes tratamentos. Além disso, o conteúdo de éster sulfato concorda com os resultados obtidos por Mendoza et al. (2006) que encontraram valores entre 26,0 e 26,4 % para carragenana nativa extraída de *Kappaphycus striatum* (predominantemente κ -carragenana). Hayashi, Paula e Chow (2007a) encontraram valores de conteúdo de sulfato que variaram de 23,08 a 33,48 % para carragenanas extraídas das linhagens marrom, verde e vermelha de *K. alvarezii*,

submetidas a tratamento alcalino, colhidas nos meses de maio, agosto e outubro, e cultivadas no litoral de São Paulo, Brasil.

A relação sulfato/carboidrato se mostrou similar para a carragenana comercial (0,33) e nativa (0,35). Através desta relação pode-se sugerir que as duas amostras de carragenana possuem o mesmo número de grupos sulfato por unidade de carboidrato. Sendo assim, podemos esperar que a carragenana nativa seja composta, assim como a carragenana comercial, de grande proporção da carragenana menos sulfatada, ou seja, κ -carragenana.

A carragenana nativa contém maior ($p < 0,05$) quantidade de resíduo mineral fixo comparada a carragenana comercial (Tabela 6). Ambas carragenanas, comercial e nativa apresentaram grande quantidade de potássio (cerca de 11g/100g de amostra) podendo ser consideradas como fontes de potássio na dieta. A carragenana comercial e nativa diferiram ($p < 0,05$) nas quantidades de ferro, fósforo, cálcio e sódio. Destaca-se o maior conteúdo de sódio na carragenana nativa, mostrando que a metodologia de extração utilizada não remove resíduos de cloreto de sódio provindos do cultivo marinho.

A presença de sais, em geral, afeta a transição conformacional e o comportamento de gelificação das carragenanas (MICHEL; MESTDAGH; AXELOS, 1997). Segundo Rochas e Rinaudo (1980), os cátions podem ser divididos em três categorias em relação a sua eficiência na promoção de hélices, no caso da κ -carragenana cátions monovalentes não específicos (Na, Li) < cátions divalentes (Ca, Mg) < cátions monovalentes específicos (K, Cs). Esta classificação foi comprovada em outros estudos (MICHEL; MESTDAGH; AXELOS, 1997). Contudo, o sódio presente na carragenana nativa não é tão eficaz para promoção do gel como o potássio. Estes dois cátions monovalentes podem competir pelos grupos éster sulfato e, a grande quantidade de sódio na carragenana nativa pode influenciar na gelificação, prejudicando a formação de hélices e consequentemente a força do gel. Isto pode explicar os diferentes resultados obtidos no teste de relaxação. Uma alternativa para reduzir a quantidade de sais presentes na carragenana seria realizar diálise após o processo de extração.

4.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Espectroscopia no infravermelho (IR) é usada para diferenciar e caracterizar carragenanas κ , ι e λ (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986;

PEREIRA et al., 2003; PRADO-FERNANDÉZ et al., 2003; MENDOZA et al., 2006; HILLIOU et al., 2006; PEREIRA et al., 2009b). É uma técnica rápida, não destrutiva e requer pouca quantidade de amostra. As absorvâncias na região do IR permitem o conhecimento da presença de 3,6-anidrogactose (930 cm^{-1}), sulfato ($1250, 1370\text{ cm}^{-1}$), gactose-4-sulfato (845 cm^{-1}), gactose-2-sulfato (830 cm^{-1}), gactose-6-sulfato (820 cm^{-1}) e 3,6 anidrogactose-2-sulfato (805 cm^{-1}) em polímeros (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986; PRADO-FERNANDÉZ et al., 2003). As atribuições dos espectros em infravermelho, mostradas na Tabela 7, foram baseados principalmente em estudos prévios de Prado-Fernández et al. (2003) e Pereira et al. (2009b).

Uma forte absorvância a $1640\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ presente em todas as análises é referente à água (UY et al.; 2005). A região entre 1010 e 1080 cm^{-1} é atribuída as ligações glicosídicas presentes em todas as carragenanas (PEREIRA et al., 2003; UY et al.; 2005). Duas bandas em aproximadamente 1070 e 930 cm^{-1} são associadas com a presença de ponte C3-O-C6 do resíduo de anidrogactose. Estas bandas são ausentes nos espectros de μ , ν e λ carragenanas. Por outro lado, a presença de grupos sulfato dá origem a bandas características dependendo da posição do sulfato no anel de gactose ou de 3,6-anidrogactose. Por exemplo, quando o grupo sulfato ocupa a posição 2 no anel de 3,6-anidrogactose (carragenanas ι e θ) duas bandas são esperadas: 905 e 805 cm^{-1} . Por outro lado, se a posição 6 é sulfatada como em μ , ν e λ as bandas são esperadas em aproximadamente 820 e 867 cm^{-1} . E, finalmente, se os carbonos nas posições 2 e 4 da gactose são sulfatados, esperam-se bandas em 830 e 845 cm^{-1} , respectivamente (PEREIRA et al., 2009b).

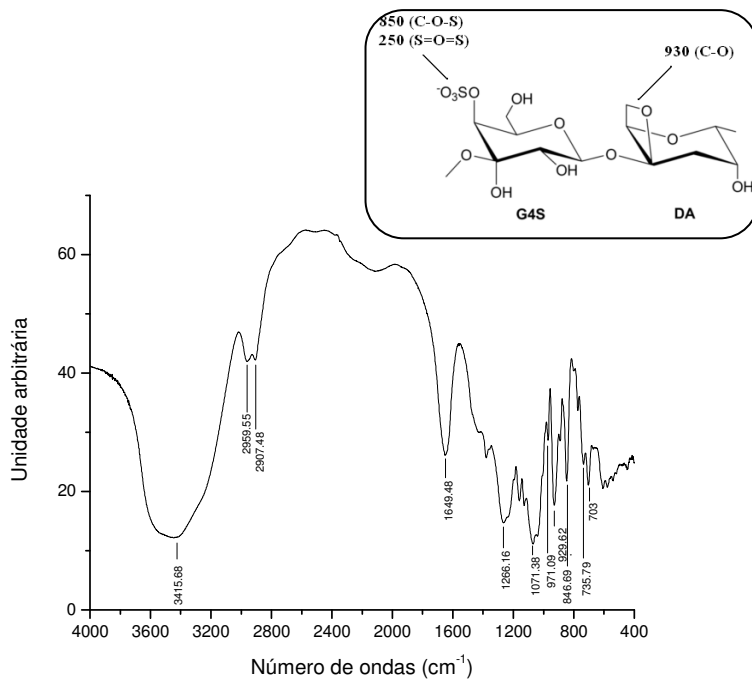
A Figura 10 (a, b, c, d, e) mostra os espectros dos padrões de κ , ι e λ -carragenana (acompanhadas da estrutura química indicando os números de onda mais característicos de cada pico no IR bem como sua interpretação química (Prado-Fernández et al., 2003) e, das carragenanas comercial (predominantemente κ) e nativa respectivamente.

Tabela 7 - Identificação dos tipos de carragenana por espectroscopia no infravermelho

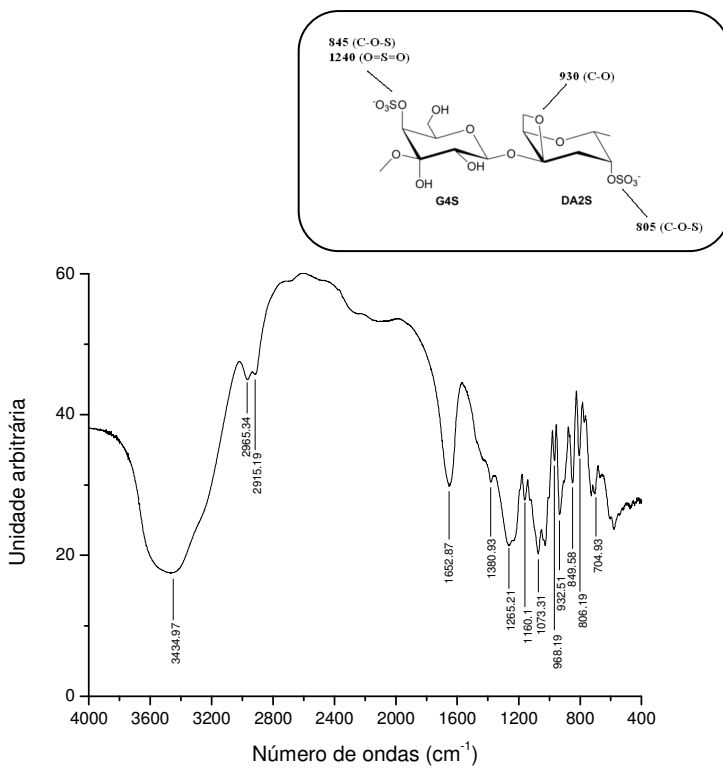
Número de Onda (cm ⁻¹)	Ligações/ grupos	Tipo de carragenana					
		kappa (κ)	Mu (μ)	Iota (ι)	Nu (ν)	Theta (θ)	Lambda (λ)
1380-1355	sulfatos	+	++	++	+++	++	+++
1240-1260	S=O de ésteres sulfato	+	++	++	+++	++	+++
1070	C-O de 3,6-anidrogactose	+	-	+	-	+	-
1026	S=O em C ₂ (alongamento pseudo-simétrico)	-	-	+	+	+	+
1012	S=O em C ₆ (alongamento pseudo-simétrico)	-	+	-	+	+	+
970-975	Galactose	+	+	+	+	-	-
930	C-O de 3,6-anidrogactose	+	-	+	-	+	-
905	C-O-SO ₃ sobre C ₂ da 3,6-anidrogactose	-	-	+	-	+	-
867	C-O-SO ₃ sobre C ₆ da galactose	-	+	-	+	-	+
840-850	C-O-SO ₃ sobre C ₄ da galactose	+	+	+	+	-	-
825-830	C-O-SO ₃ sobre C ₂ da galactose	-	-	-	+	+	+
810-820	C-O-SO ₃ sobre C ₆ da galactose	-	+	-	+	-	+
805	C-O-SO ₃ sobre C ₂ da 3,6-anidrogactose	-	-	+	-	+	-
725-740	C-O-C α(1,3)	+	-	+	-	-	-
700-705	sulfatos em C ₄ galactose	+	+	+	+	-	-

-, ausência, + médio, ++ forte, +++ muito forte

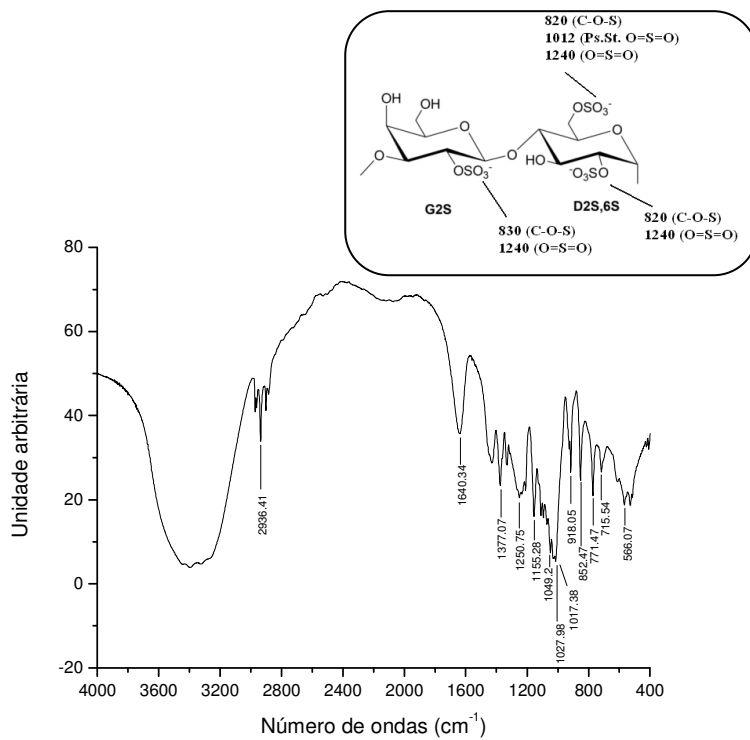
Adaptada de Prado-Fernández et al., 2003 e Pereira et al., 2009b.

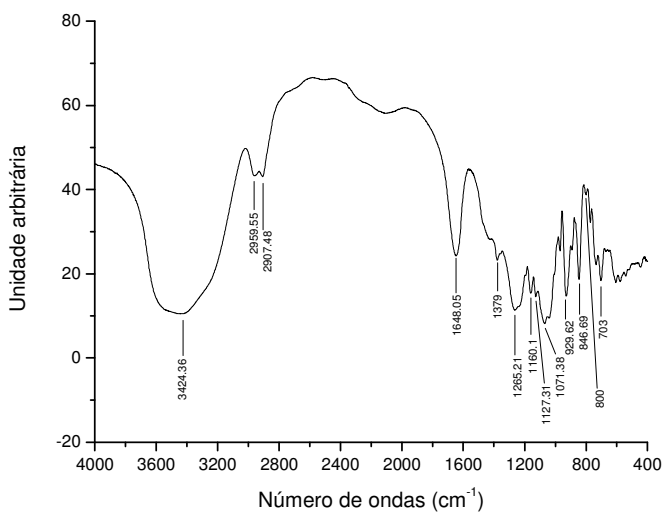


(a) κ-carragenana

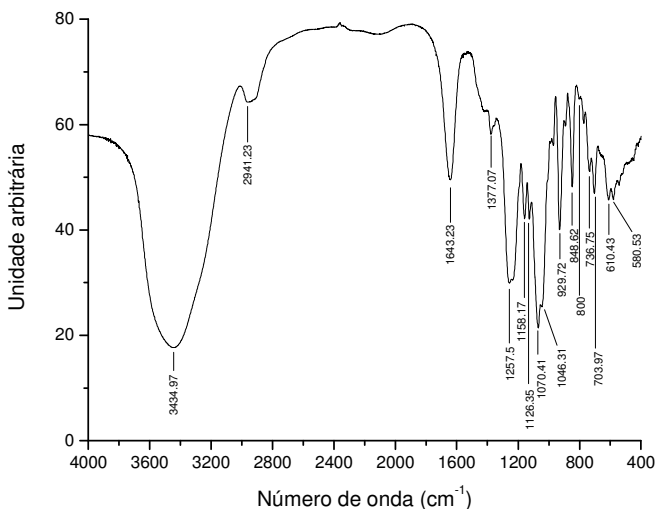


(b) 1-carragenana

(c) λ -carragenana



(c) carragenana comercial



(e) carragenana nativa

Figura 10 - Espectro FTIR das amostras padrão de carragenana κ (a), ι (b), λ (c) e das amostras comercial (d) e nativa (e)

Todas as amostras, tanto os padrões quanto as carragenanas comercial e nativa (extraída na condição otimizada) apresentaram uma absorção na região em $1250\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ atribuída a grupos éster sulfato total. A ι -carragenana possui uma banda característica próximo a 805 cm^{-1} , que está associada ao grupo sulfato no C2 da unidade 3,6-anidrogactose. Esta banda está presente no espectro da amostra padrão de ι -carragenana (Figura 10b) e não está presente nos espectros das carragenanas comercial, predominantemente κ , e da carragenana nativa, Figuras 10d e 10e, respectivamente.

Todos os espectros analisados tiveram bandas de absorção forte, características de polissacarídeos na região de $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$. Duas outras bandas podem ser usadas para determinar exatamente em qual posição estão os sulfatos. Sulfatos na posição C4 (no anel de gactose) são demonstrados na banda a $845\text{--}850\text{ cm}^{-1}$, como visto nos espectros que contém κ ou ι carragenanas (Figuras 10a, 10b, 10d e 10e). A ι -carragenana tem uma característica adicional na banda próxima a 805 cm^{-1} , associada a estrutura 3,6 anidrogactose-2-sulfato, a qual só pode ser vista no espectro do padrão da ι -carragenana, demonstrando que a

carragenana extraída na condição otimizada contém pouca ou nenhuma quantidade ι . A presença de 3,6-anidrogactose na amostra é confirmada pela ocorrência de uma forte absorbância na banda em aproximadamente 930 cm^{-1} (ROCHAS; LAHAYE; YAPHE, 1986).

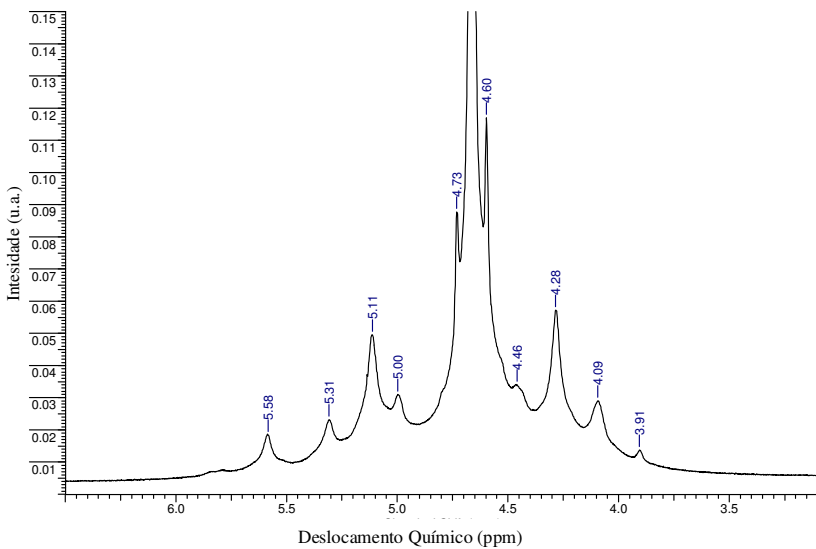
λ -carragenana possui duas bandas características na região de 1027 e 1012 cm^{-1} correspondentes a galactose-2-sulfato e galactose-6-sulfato, respectivamente (PRADO-FERNÁNDEZ et al., 2003). Estas duas bandas podem ser vistas na Figura 10c, que mostra o espectro no infravermelho das amostras padrão de λ -carragenana. A carragenana comercial não apresenta nenhuma das bandas correspondentes a λ -carragenana (1026 cm^{-1} , 867 cm^{-1} , 830 cm^{-1} e 820 cm^{-1}), o que confirma a presença de quantidade muito pequena ou até mesmo ausência de λ -carragenana misturada a κ -carragenana na amostra comercial e na amostra nativa.

Os espectros obtidos através de IR indicaram que os ficolóides extraídos de *K. alvarezii* são predominantemente κ -carragenana com resíduos de ι -carragenana. Conforme foi observado em estudos anteriores utilizando vários métodos espectroscópicos (ROCHAS, RINAUDO, LANDRY; 1989; KNUTSEN et al.; 2001; VAN DE VELDE, 2001; ESTEVEZ, CIANCIA, CEREZO; 2004; UY et al.; 2005; VAN DE VELDE et al.; 2005; PEREIRA et al., 2009a e b). Além disso, as análises relataram a ausência de precursores (Figura 10e). A maior intensidade da absorbância a 1250 cm^{-1} na carragenana extraída de *K. alvarezii* quando comparada com a carragenana comercial foi também observada e está de acordo com o conteúdo de sulfatos analisado por método turbidimétrico (Tabela 6).

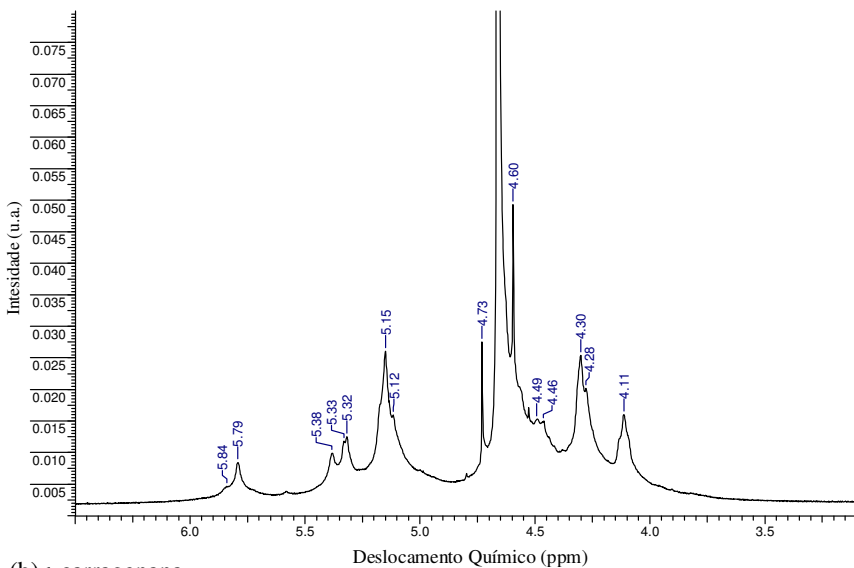
4.4 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A Figura 11 (a, b, c, d, e) apresenta os espectros de ^1H RMN para as carragenanas κ , ι , λ , comercial e nativa, respectivamente. Tojo e Prado (2003) demonstraram que com o aumento da temperatura de análise ocorre um deslocamento para valores de campo mais desblindados. De acordo com seus dados, o deslocamento do hidrogênio ligado ao carbono 1 anomérico do resíduo de anidrogactose, para a κ -carragenana, sofre um deslocamento de $5,52\text{ ppm}$ a $60\text{ }^\circ\text{C}$ para $5,81\text{ ppm}$ a $90\text{ }^\circ\text{C}$, enquanto este mesmo hidrogênio,

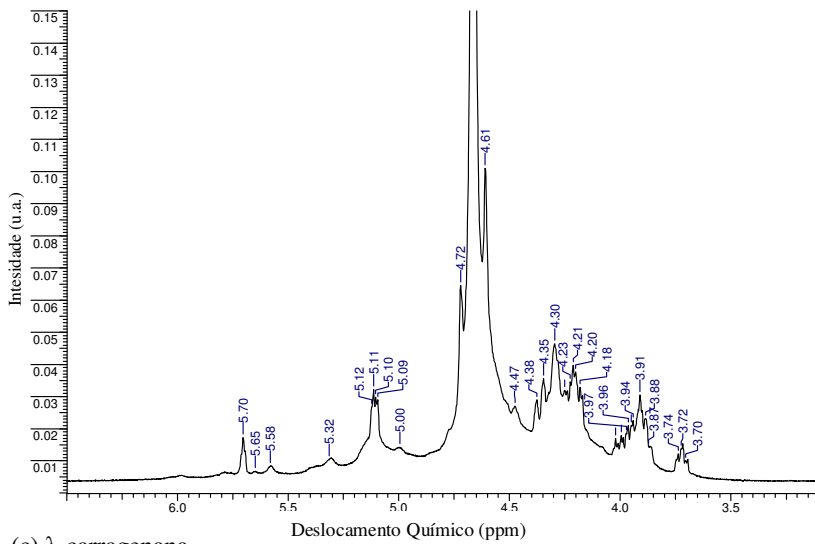
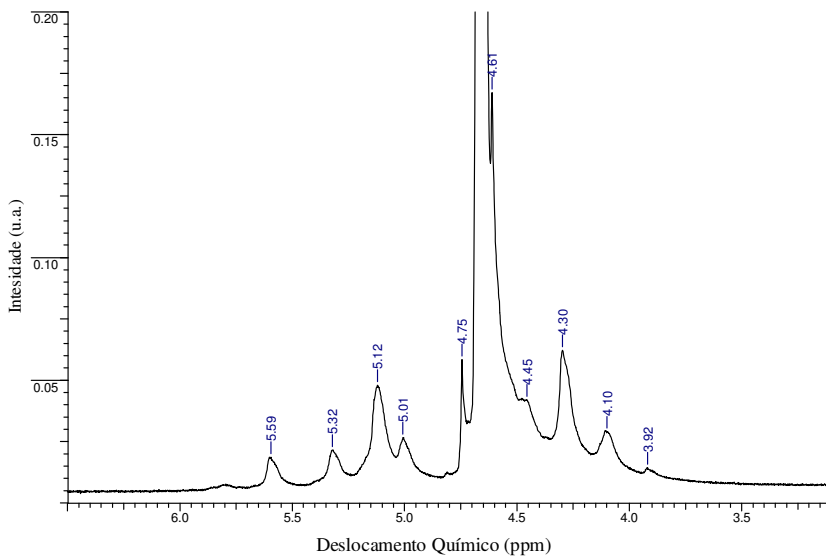
para a ι-carragenana, sofre um deslocamento de 5,73 ppm a 60 °C para 6,04 ppm a 90 °C.



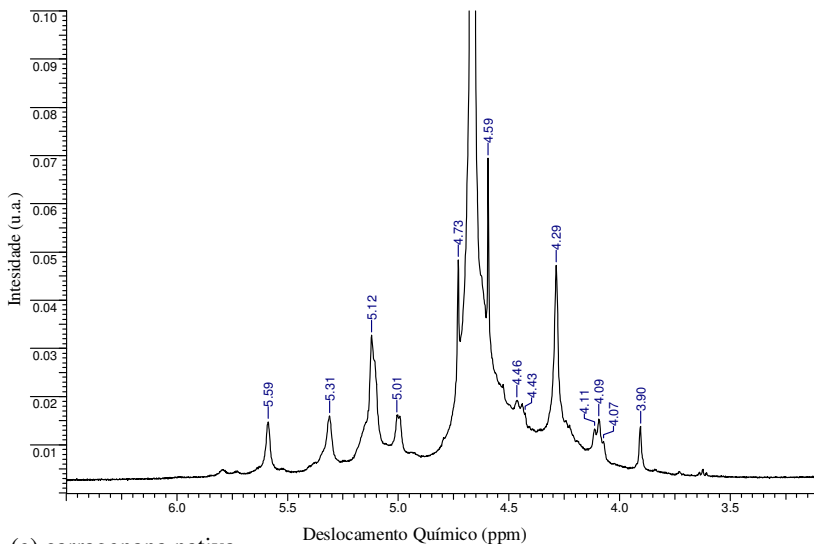
(a) κ-carragenana



(b) ι-carragenana

(c) λ -carragenana

(d) carragenana comercial



(e) carragenana nativa

Figura 11 - Espectros de ^1H RMN para as carragenanas κ (a), ι (b), λ (c), comercial (d) e nativa (e)

Os espectros demonstrados no presente trabalho foram obtidos na temperatura de 85 °C, por questões técnicas do equipamento e com o intuito de manter as amostras no estado sol (gel fundido), além de diminuir a viscosidade da amostra. Assim, percebe-se claramente que o deslocamento químico para o hidrogênio ligado ao carbono 1 anomérico do resíduo de anidrogactose está a 5,59 ppm para a amostra padrão de κ -carragenana e a 5,79 ppm para a amostra padrão de ι -carragenana, devido a presença do grupo sulfato no carbono 2. A λ -carragenana padrão, como já relatado na literatura (TOJO; PRADO, 2003; GUIBET et al., 2006) apresenta um espectro com diversos multipletes e apenas um único pico referente ao deslocamento do próton anomérico ligado ao carbono 1 do resíduo de 2,6-sulfato-galactose, neste caso a 5,70 ppm.

Tanto o espectro da carragenana comercial como o espectro da carragenana extraída na condição otimizada, apresentam um pico a 5,59 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao carbono 1 anomérico do resíduo de anidrogactose, pico este característico de amostras de κ -carragenana. Portanto, conclui-se que a carragenana extraída na condição otimizada apresenta uma estrutura na forma de κ -carragenana, assim como nas análises por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier, onde esta mesma estrutura para a amostra

extraída de *Kappaphycus alvarezii* na condição otimizada, tinha sido presumida.

4.5 ESPALHAMENTO DE RAIOS X A BAIXOS ÂNGULOS

A intensidade de espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) em função da temperatura das amostras é apresentada na Figura 12.

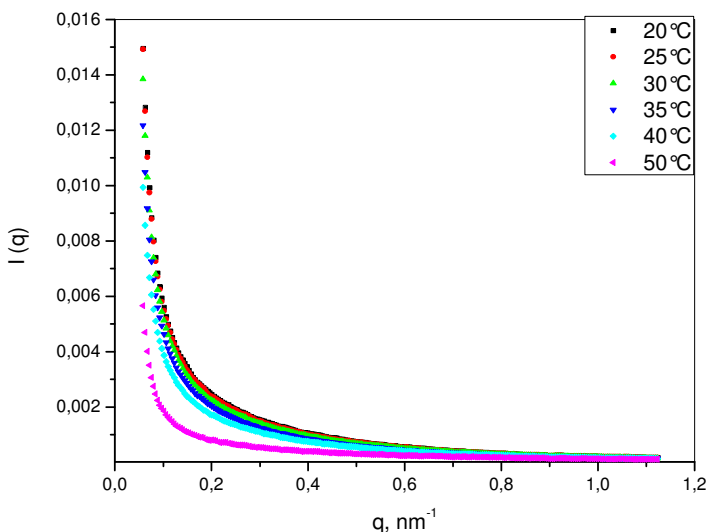


Figura 12 - Espalhamento de raios-X a baixos ângulos para a carragenana nativa a diferentes temperaturas

Observa-se (Figura 12) um aumento da intensidade de espalhamento com o decréscimo da temperatura da solução de carragenana a 1,5 % (m/v) sem a adição de qualquer contra-íon. De acordo com Tomsic, Prossnigg e Glatter (2008), este aumento da intensidade de espalhamento a baixos ângulos expressa a presença de uma estrutura em rede de larga-escala, ou em outras palavras, um alto grau de agregação intermolecular. Com o aumento da temperatura

ocorre uma queda da intensidade de espalhamento, inicialmente não tão acentuada até que a 50 °C ocorre uma queda brusca da intensidade de espalhamento. Nesta temperatura específica ocorre uma transição gel-sol. Este decréscimo gradual da intensidade de espalhamento sob um intervalo de temperatura reflete uma queda nas interações intermoleculares e enfraquecimento da rede do gel. Ou seja, quando as ligações intermoleculares começam a quebrar, a estrutura da rede está começando a enfraquecer e as moléculas perdem sua estrutura e a organização da rede desaparece. Durante este processo de fusão de rede existem ainda regiões de ligações intermoleculares remanescentes que ainda rendem um ligeiro aumento na intensidade de espalhamento a ângulos baixos, mas estão rapidamente desaparecendo com o aumento da temperatura.

Todos estes resultados estão em concordância com o mecanismo de gelificação descrito, onde a primeira alteração conformacional das moléculas de carragenanas de corda para hélices ocorre e é seguida pela agregação destas hélices para formar uma grande estrutura de rede (KARA et al., 2003; KARA et al., 2006; IJIMA et al., 2007; YUGUCHI, 2009).

A intensidade de SAXS de soluções também pode ser interpretada pelo formalismo de Guinier, descrito na Equação 2. De acordo com esta aproximação, é possível se obter o raio de giração R_g a partir do coeficiente angular da seção linear das curvas de SAXS no limite $q \rightarrow 0$ no gráfico de Guinier, isto é, $\ln(I(q))$ vs q^2 . A Figura 23 apresenta os valores do raio de giração em diferentes temperaturas da solução de carragenana a 1,5 %. Os valores para o raio de giração ficaram entre 22,65 nm (40 °C) e 25,61 nm (50 °C). A temperatura de 50 °C o raio de giração se apresentou maior, provavelmente devido a expansão das partículas no estado sol, conforme averiguado na Figura 13.

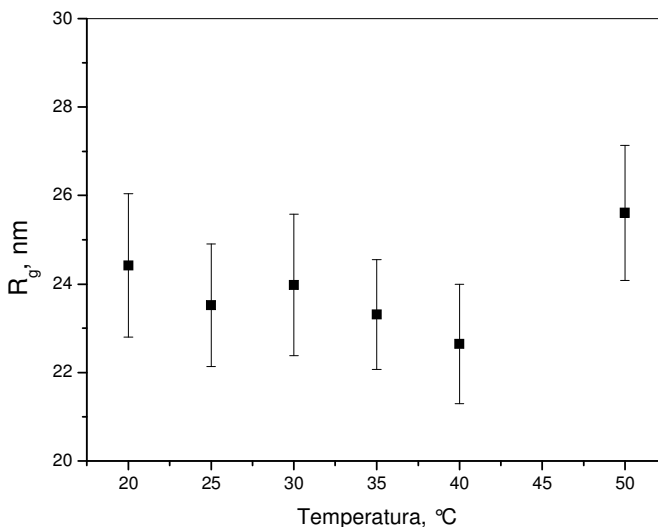


Figura 13 - Raios de giração obtidos nas diversas temperaturas estimados através das análises de espalhamento de raios-X a baixos ângulos para a carragenana nativa

4.6 CROMATOGRAFIA DE PERMEACÃO EM GEL

A análise de cromatografia de permeação em gel - CPG foi utilizada para definir a massa molar da carragenana extraída de *K. alvarezii* na condição otimizada. A Tabela 8 mostra os dados obtidos para a massa molecular média (M_z), a massa molecular numérica (M_n), a massa molecular média ponderal (M_w), o índice de polidispersidade (M_w/M_n) e o raio hidrodinâmico (R_h).

Tabela 8 - Massa molecular média, massa molecular numérica, massa molecular média ponderal, o índice de polidispersidade e o raio hidrodinâmico da carragenana nativa

	Mz (g.mol ⁻¹)	Mw (g.mol ⁻¹)	Mn (g.mol ⁻¹)	Mw/Mn	Rh (nm)
Carragenana Nativa	489.063	259.882	81.667	3,18	21,83

O valor encontrado para a massa molecular ponderal média (Mw) foi de aproximadamente 259.882 g.Mol⁻¹, que está abaixo dos valores reportados em estudos anteriores por SEC-MALLS (cromatografia de exclusão por tamanho acoplada a espalhamento de luz a laser em múltiplos ângulos) (404.000-444.000 g.Mol⁻¹) para carragenana híbrida κ/ι de *K. alvarezii* (VAN DE VELDE et al., 2005) e próximo aos valores determinado por CPG-LS (353.000, 523.000, 327.000 e 675.000 g.Mol⁻¹) para κ -carragenana (SLOOTMAEKERS et al., 1991; MYSLABODSKI; STANCIOFF; HEKERT, 1996; VIEBKE; WILLIAMS, 2000, respectivamente). Hayashi et al. (2007b) compararam as massas moleculares de carragenanas extraídas de *K. alvarezii* (cultivada no litoral brasileiro) pelo método natural e pelo método alcalino com uma carragenana comercial. A carragenana extraída pelo método natural mostrou massa molecular de 1.200.000 a 1.800.000 g.Mol⁻¹ e a carragenana extraída pelo método alcalino de 1.800.000 a 2.750.000 g.Mol⁻¹, enquanto encontraram valores para a carragenana comercial da ordem de 480.000 a 540.000 g.Mol⁻¹. A massa molecular depende da fonte da carragenana e também do método utilizado na extração (VAN DE VELDE et al.; 2005).

A massa molecular ponderal média apresentada pela carragenana nativa está acima do valor crítico de 180.000 g.Mol⁻¹. Abaixo deste valor o módulo elástico é considerado dependente da massa molecular (ROCHAS; RINAUDO; LANDRY, 1990). Além disso, o valor da massa molar está acima de 50.000 g.Mol⁻¹, valor relacionado com danos à saúde (*European Scientific Committee on Food* – SCF, 2003).

A distribuição das massas moleculares da carragenana no polímero, indicada pelo índice de polidispersidade, concorda com os resultados obtidos por Mendoza et al. (2006) que encontraram valores entre 2,4 e 3,1 para carragenana nativa extraída de *Kappaphycus striatum* (predominantemente κ -carragenana). Hilliou et al. (2006) ao trabalhar em condição alcalina em diversas condições de tempo (0,5; 1; 2; 4 e 6 h) e temperatura (80; 95 e 110°C) com a alga *Mastocarpus stellatus* (predomínio de κ -carragenana), encontraram por cromatografia de exclusão molecular, massa molecular numérica (Mn) que variaram

entre $0,15 \cdot 10^6 \text{ g.Mol}^{-1}$ e $0,55 \cdot 10^6 \text{ g.Mol}^{-1}$ e massa molecular ponderal média (Mw) entre $0,4 \cdot 10^6 \text{ g.Mol}^{-1}$, e $1,14 \cdot 10^6 \text{ g.Mol}^{-1}$ com consequente índice de polidispersidade variando entre 2,4 a 4,0, resultados estes extremamente próximos aos encontrados no presente trabalho, onde não se trabalhou em condição alcalina.

O raio de giração correspondente, encontrado por espalhamento de raios X a baixos ângulos, foi de 24 nm e o raio hidrodinâmico correspondente foi 21,83 nm.

A razão entre o raio de giração $\langle R_g \rangle$ e o raio hidrodinâmico $\langle R_h \rangle$ é chamada de fator- p , um valor experimental derivado da combinação das características de tamanho de partículas. O fator- p fornece uma indicação da topologia da partícula, especialmente para partículas comparativamente pequenas (entre 10 – 100 nm). O fator- p é definido por R_g/R_h .

O fator- p obtido para a amostra de carragenana nativa foi de 1,10, valor próxima para uma esfera oca que é de 1,00.

Percebe-se da análise da tabela de massas moleculares e polidispersidade que a amostra de carragenana nativa é muito polidispersa, onde M_w/M_n é igual a 3,18. Assim a contribuição de cadeias com massa molecular pequena é mais significativa, além disso, a alta concentração de íons potássio (K^+) atuando como contra-íons dos grupos sulfato da carragenana reduz a repulsão eletrostática das cadeias poliméricas, tornando a estrutura mais enovelada e compacta, o que se traduz num fator- p próxima a 1. A Tabela 9 a seguir apresenta uma relação entre alguns valores de fator- p e a respectiva topologia associada.

Tabela 9 - Relação entre o fator- p e a morfologia das partículas

Topologia	fator- p
Esfera homogênea ideal	0,775
Esfera oca	1
Elipsóide	0,775-4
Cadeia polimérica enovelada randomicamente	1,505

Adaptada de Wolfgang Scharlt, 2007.

4.7 VISCOSIDADE

A carragenana comercial e a nativa tiveram comportamento Newtoniano a uma concentração de 1,5 % (m/m) e temperatura de 75 °C. Fluidos Newtonianos, a temperatura e pressão constantes, são caracterizados por possuírem a tensão de cisalhamento diretamente proporcional a taxa de deformação e não possuírem limite de escoamento (Figura 14) (RAO, 1977; MARCOTTE; HOSHAHILI; RAMASWAMY, 2001).

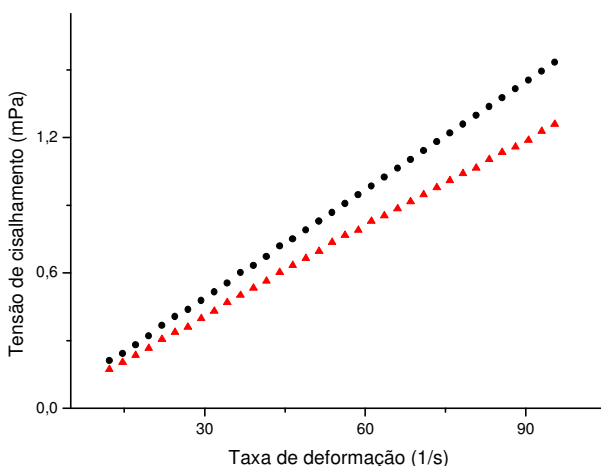


Figura 14 - Curva de fluxo das carragenanas: ▲ comercial e ● nativa

Uma linha de tendência traçada nos dados apresentados no gráfico da Figura 14, com intercepto definido no ponto zero (não existindo limite de escoamento), resultou em um coeficiente de correlação (R^2) de 0,99997 para a carragenana nativa e de 0,99983 para a carragenana comercial. Esta boa linearidade apresentada confirma o comportamento Newtoniano das amostras, nas condições experimentais.

A carragenana pode apresentar vários comportamentos de fluxo, pois estes comportamentos são influenciados pela temperatura e pela concentração da solução de carragenana. Um aumento na concentração de carragenana é acompanhado de um aumento na pseudoplasticidade e, sob altas temperaturas (≥ 75 °C) a solução de carragenana tende a se

comportar como fluido Newtoniano (MARCOTTE; HOSHAHLI; RAMASWAMY, 2001).

A viscosidade da carragenana nativa foi de 16 cP, similar ao valor encontrado para a carragenana comercial de aproximadamente 13 cP. Estes resultados concordam com os valores encontrados em estudo realizado por Reis, Yoneshingue-Valentin e Santos (2008), no qual carragenanas extraídas de *Hypnea musciformis*, fonte de κ -carragenana, cultivadas no Rio de Janeiro – Brasil mostraram viscosidade entre 4 e 53 cP. Esta variação foi encontrada, para amostras coletadas em quatro praias de diferentes regiões do Rio de Janeiro e, em diferentes meses do ano (REIS; YONESHIGUE-VALENTIN; SANTOS, 2008). Os valores relativos à viscosidade encontrados por Mendoza et al. (2006) para carragenana extraída de *K. striatum* pelo método alcalino foram de 18 cP (para segmentos da base) e 22 cP (para segmentos do ápice) e, para a forma nativa da carragenana foram de 53 cP e 101 cP, para segmentos da base e do ápice, respectivamente.

Hung et al. (2009) estudaram a viscosidade de carragenana de *K. alvarezii* (cultivadas no Vietnã) de diferentes linhagens (marrom, vermelha e verde) e colhidas em diversas épocas do ano. Os valores de viscosidade encontrados para a carragenana extraída de *K. alvarezii*, linhagem marrom variaram de 83 a 118 cP dependendo da estação do ano. Além disso, Muñoz et al. (2004) encontraram, para a carragenana extraída de *K. alvarezii* (cultivada no México) linhagem marrom, valores entre 122,2 e 147,2 cP. Apesar de estes estudos tratarem da mesma alga analisada no presente trabalho, esta diferença pode ser ocasionada pelas diferentes condições de cultivo (como salinidade, temperatura da água, pH, entre outros), pelos diferentes métodos de extração, como também, pelas diferentes técnicas analíticas utilizadas.

4.8 TESTE DE RELAXAÇÃO

As curvas de relaxação das amostras de carragenana comercial e de carragenana de *K. alvarezii* extraída na condição otimizada são mostradas na Figura 15.

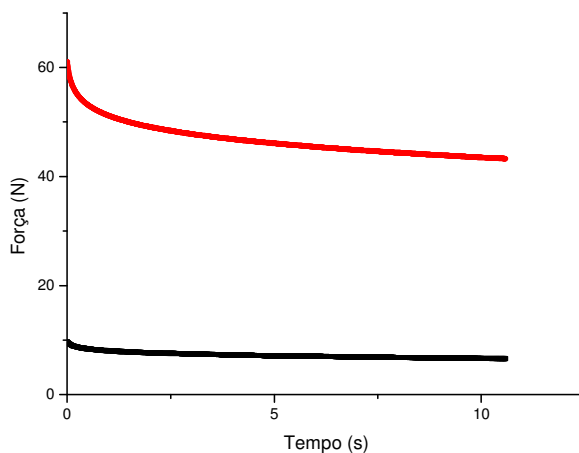


Figura 15 - Curvas de relaxação das carragenanas: ● comercial (3 % m/m) e ● nativa (3% m/m)

Percebe-se pela análise das curvas que ocorreu uma queda exponencial da força/tensão em função do tempo de aplicação desta força/tensão. O comportamento das carragenanas no teste de relaxação variou consideravelmente. Entretanto, ambas as curvas apresentaram formas características de materiais viscoelásticos, com uma força residual tendendo a um valor assintótico (PELEG, 1979; PELEG, 1980; MÜLLER, LAURINDO; YAMASHITA, 2009).

O comportamento viscoelástico da carragenana é reportado também em estudos com κ -carragenana em diferentes concentrações (MAMMARELLA; PIANTE VICÍN; RUBIOLO, 2002) e com κ -carragenana misturada com outra goma ou produto alimentício (KAMPF; NUSSINOVITCH, 1997; FISZMAN; PONS; DAMÁSIO, 1998). Porém, a magnitude dos resultados das análises de textura, em geral, devido à natureza dos métodos analíticos, depende muito da geometria (como, por exemplo, da amostra e das dimensões da sonda de penetração) e das condições do teste (especialmente do nível de deformação selecionado arbitrariamente). Por esta razão, resultados publicados por diversos autores dificilmente podem ser comparados ou expressos em termos de parâmetros mecânicos fundamentais, tais como módulo ou força do gel (PELEG, 1976; PELEG 1977; LEE, ROSENAU, PELEG 1983).

Os dados obtidos por meio do teste de relaxação e determinados através do modelo de Peleg (Equação 8) são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros reológicos de relaxação das carragenanas nativa e comercial. Grau de solidez, taxa inicial de decaimento da força, força máxima aplicada em $t=0$ (F_0) e razão de relaxação

	Grau de solidez ($1-c_1$) (-)	Taxa inicial de decaimento da força (c_1/c_2) (s)	F_0 (N)	R_{RELAX} (%)
CN	0,626 ^a \pm 0,008	0,741 ^a \pm 0,094	9,215 ^a \pm 0,686	63,495 ^a \pm 1,048
CC	0,660 ^b \pm 0,013	0,758 ^a \pm 0,021	60,963 ^b \pm 2,675	66,479 ^b \pm 1,076

CN carragenana nativa

CC carragenana comercial

^{a,b,c} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças ($p < 0,05$) entre as diferentes carragenanas estudadas.

Seguindo o modelo empírico de Peleg (1980), quando $t \rightarrow \infty$, $F(t)/F_0 \rightarrow 1 - c_1$, observa-se que o material relaxa totalmente se $c_1 = 1$ e $1 - c_1 = 0$, ou seja, $1 - c_1$ serve como um indicativo do “grau de solidez” do alimento, onde em uma escala de 0 a 1, 0 é considerado um líquido e 1 um sólido elástico ideal. Portanto, o gel da amostra de carragenana comercial possui um componente de comportamento sólido predominante quando comparado ao gel da amostra de carragenana nativa, e ambas são consideradas sólidos viscoelásticos (0,626 e 0,660).

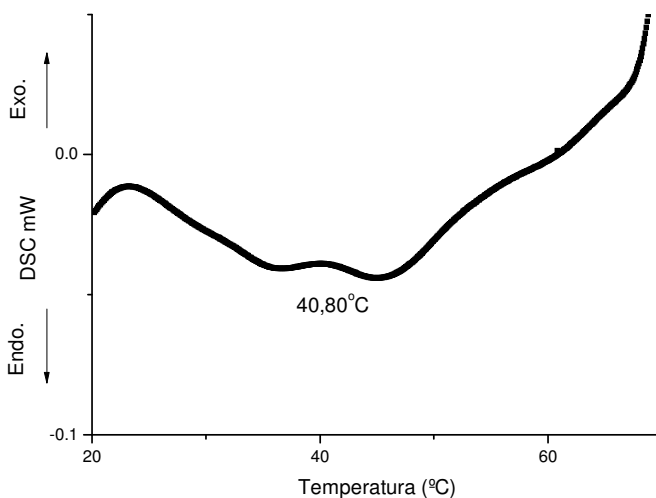
As duas carragenanas estudadas não diferiram ($p > 0,05$) quanto à taxa inicial de decaimento da força. Porém, a razão de relaxação (Equação 9) das carragenanas foi menor para a nativa, ou seja, a carragenana comercial possui uma taxa de relaxação maior, já refletida no grau de solidez. A diferença quanto a força máxima aplicada pode ter ocorrido provavelmente devido a quantidade de sódio presente na amostra nativa, visto que os outros componentes químicos (Tabela 6) e a estrutura química (predominância de κ -carragenana) se apresentaram semelhantes para as amostras comercial e nativa.

4.9 CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

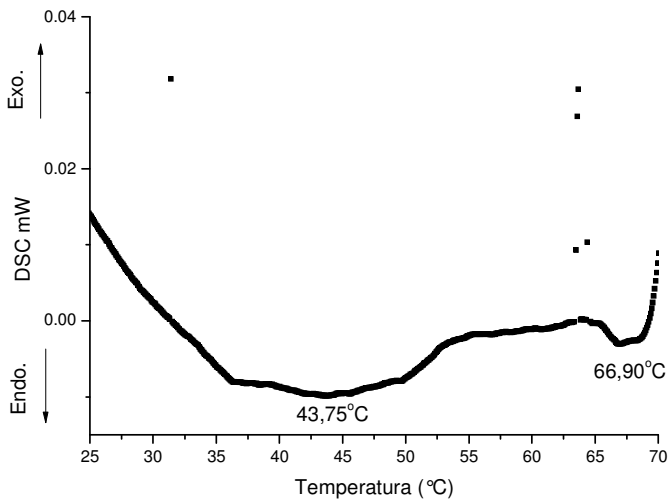
Calorimetria exploratória diferencial foi utilizada para estudar as transições gel \leftrightarrow sol nas amostras de carragenana. A Figura 16 mostra

o termograma calorimétrico de aquecimento de géis (1,5 % m/m) de amostras de carragenanas (a) κ , (b) ι , (c) comercial e (d) extraída de *Kappaphycus alvarezii* na condição otimizada.

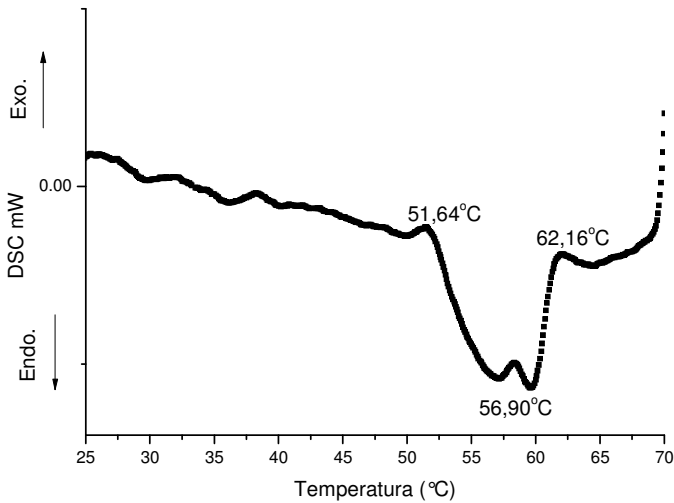
Durante o aquecimento, ligações de hidrogênio são quebradas e duplas hélices mudam sua conformação dando origem a uma fusão de agregados, ou seja, uma rede desmembrada. A transição ocorre não em uma temperatura única, mas em um intervalo de temperatura, o qual o pico foi tomado como a temperatura de fusão (T_{g-s}) (NÚÑEZ-SANTIAGO; TECANTE, 2007). Foram observados picos endotérmicos nas curvas de aquecimento dos quatro tipos da carragenana analisados referentes à transição gel-sol. As temperaturas de transição gel-sol relativas aos picos endotérmicos observadas no aquecimento estão descritas na Tabela 11. Os termogramas apresentam uma única transição endotérmica para as amostras de κ -carragenana (Figura 16a), comercial (Figura 16c) e extraída de *K. alvarezii* na condição otimizada (Figura 16d), enquanto que a ι -carragenana apresentou duas transições térmicas, estas transições estão associadas a fusão do gel e dissociação de agregados.



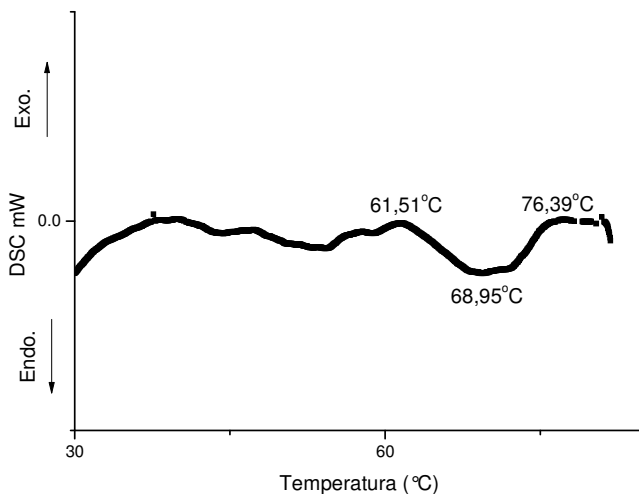
(a) κ -carragenana



(b) ι-carragenana



(c) carragenana comercial



(d) carragenana nativa

Figura 16 - Termograma calorimétrico de aquecimento de solução aquosa de carragenana 1,5 % (a) κ , (b) ι , (c) comercial e (d) nativa. Taxa de aquecimento 5 °C/min

A carragenana comercial e a carragenana extraída na condição otimizada apresentam predominantemente κ -carragenana em sua composição, porém possuem uma agregação maior quando comparadas ao padrão de κ -carragenana, visto que a agregação de segmentos de hélices pode levar ao aumento de 10 °C na temperatura de fusão quando comparada a segmentos de hélices isolados (ROCHAS; RINAUDO, 1982). Este maior grau de agregação pode estar relacionado ao alto teor de íons potássio em ambas as amostras, que atua como um contra-íon aos grupos sulfato, levando a uma maior agregação entre as cadeias. Este fato já foi comprovado quando da determinação do fator- p ou razão R_g/R_h .

Baeza et al. (2002) encontraram uma temperatura de fusão para gel de κ -carragenana de 35 °C numa concentração de 0,5 % (m/v), em uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹. No presente estudo (gel a 1,5 % m/m) encontrou-se temperaturas acima do reportado por Baeza e colaboradores, entretanto, Iijima et al. (2007) reportaram um aumento na

temperatura de fusão de géis de κ -carragenana com o aumento da concentração, de 35 °C a 0,5 % (m/v) a 50 °C a 1,5 % (m/v).

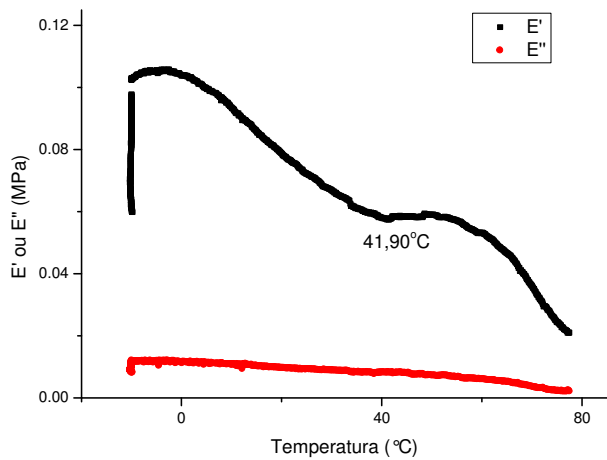
Tabela 11 - Temperaturas de transição gel-sol de géis (1,5 % m/m) de carragenanas κ , ι , comercial e extraída na condição otimizada, de acordo com os resultados obtidos em DSC

Tipo de Carragenana	T _{g-s} (°C)
Kappa	40,80
Iota	43,75
	66,90
Comercial	56,90
Nativa	68,95

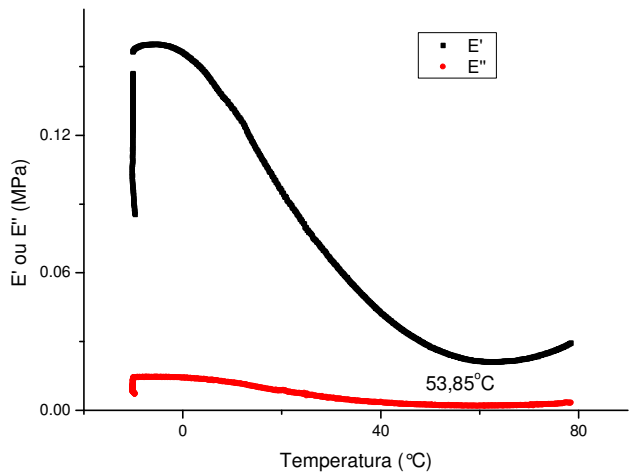
As temperaturas de transição determinadas por DSC estão de acordo com as análises químicas e reológicas apresentadas neste trabalho e são similares às encontradas por outros autores, como Hilliou et al. (2006), que encontrou temperaturas de transição gel-sol para amostras carragenanas, extraída em meio alcalino em diversas condições de tempo (0,5; 1; 2; 4 e 6 h) e temperatura (80 °C; 95 °C e 110 °C), entre 70 °C e 73,7 °C.

4.10 ANÁLISE TÉRMICA DINÂMICO- MECÂNICA

As Figuras 17, 18 e 19 apresentam o comportamento das carragenanas comercial e nativa a 3 % (m/m) ao serem submetidas a uma análise térmica dinâmico-mecânica. A Figura 17 mostra a dependência da temperatura dos módulos elástico e viscoso para a carragenana comercial (a) e para a carragenana nativa (b) durante o aquecimento de -10 °C a 80 °C a frequência de 1 Hz.



(a)



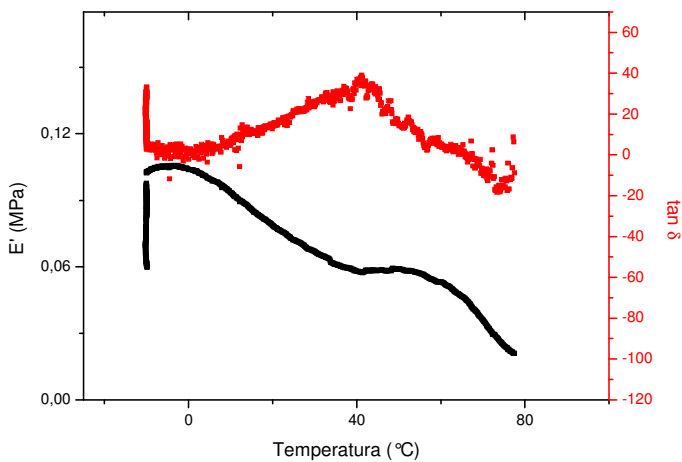
(b)

Figura 17 - Comportamento térmico dinâmico-mecânico com as curvas E' e E'' em temperaturas variando de -10 °C a 80 °C (a) carragenana comercial, (b) carragenana nativa – (■ E' e ● E'')

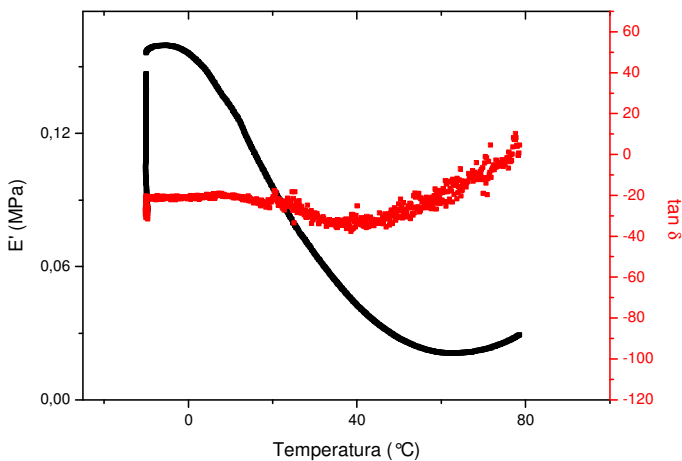
A Figura 17 apresenta a redução dos módulos (elástico e viscoso) com o aumento da temperatura. A razão entre módulo viscoso (E'') e módulo elástico (E'), definida como tangente δ ($\tan\delta$) define os géis como fortes ou fracos. Uma razão maior pode ser observada a temperaturas menores que 0 °C, nas quais o gel é mais forte. À medida que a temperatura aumenta E' se aproxima de E'' , caracterizando a ocorrência lenta da transição gel-sol. Observou-se uma inflexão na curva de módulo elástico para a amostra de carragenana comercial em uma temperatura de 41,90 °C, enquanto que esta mesma inflexão ocorreu para a amostra de carragenana extraída na condição otimizada em 53,85 °C, estas inflexões correspondem a transição gel-sol para as amostras, resultados estes que estão de acordo com as temperaturas de transição gel-sol determinadas por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Evidente que conforme a técnica empregada ocorrem variações no intervalo de temperatura encontrado.

Os resultados das análises das propriedades viscoelásticas, reportados na Figura 17, mostram que para as duas amostras o módulo elástico (E') teve maior variação que o módulo viscoso (E''), com E' maior que E'' , como esperado para materiais viscoelásticos com predominância de comportamento sólido. Os valores dos módulos elástico e viscoso são muito diferentes para as duas amostras e são dependentes da composição iônica, mas independentes da força iônica (MANGIONE et al., 2007).

A Figura 18 mostra a dependência da temperatura do módulo elástico (E') e da $\tan\delta$ (E''/E') para a carragenana comercial (a) e para a carragenana nativa (b) a 3 % (m/m) durante o aquecimento de -10 °C a 80 °C a frequência de 1 Hz.



(a)



(b)

Figura 18 - Comportamento térmico dinâmico-mecânico com as curvas E' e $\tan \delta$ em temperaturas variando de -10 °C a 80 °C (a) carragenana comercial, (b) carragenana nativa

Na Figura 18, o pico na curva $\tan\delta$ (E''/E') define a temperatura de transição (T_{g-s}). A temperatura de transição de uma fase é função de características internas da fase em transição nesta temperatura e/ou características induzidas pela fase externa envolvente nesta mesma fase em transição. Se as características implicam em um impedimento da movimentação molecular, a temperatura de transição se desloca para valores maiores. Se por outro lado isto tende a facilitar a movimentação molecular, reflete-se em uma redução na temperatura de transição. O valor máximo do pico na curva $\tan\delta$ é proporcional a sua fração volumétrica da fase em transição naquela faixa de temperatura. Na Figura 18 (b), é possível observar uma relaxação constante de grupos da cadeia polimérica a medida que a temperatura aumenta demonstrando maior sensibilidade ao aumento da temperatura. Este comportamento indicando um maior grau de solidez para a carragenana comercial já havia sido encontrado no teste de relaxação do gel.

A Figura 19 mostra o comportamento dos módulos E' e E'' das carragenanas comercial e nativa (3% m/m) quando submetidas a uma varredura de frequência a temperatura constante de 10°C.

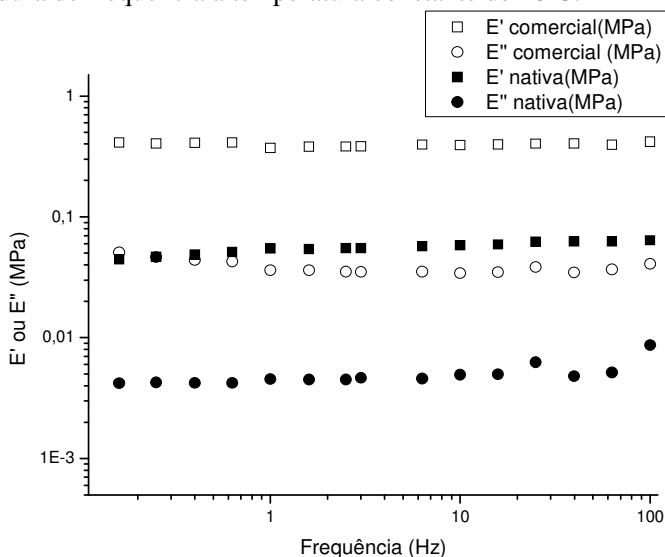


Figura 19 - Varredura de frequência comparando a amostra comercial com a amostra nativa de carragenana a 10 °C. Quadrados, E' ; Círculos, E'' ; símbolo aberto, comercial; símbolo fechado nativa

Os gráficos apresentados na Figura 19 demonstram que a carragenana comercial é mais resistente ao aumento da frequência da tensão aplicada, pois os módulos E' e E'' são maiores quando comparados a carragenana nativa. Isto porque a carragenana comercial possui uma agregação maior, como demonstrado no perfil de textura e nos testes de relaxação, isto é, apresenta-se como um gel mais forte. As curvas demonstram que a 10 °C, neste intervalo de varredura de frequência do teste, não houve alterações na estrutura física das amostras, e estas mantiverem um comportamento de gel, com forte componente sólido, em predominância ao comportamento viscoso. A diferença entre E' e E'' a altas frequências é reduzida, principalmente quando as amostras são submetidas a altas temperaturas (CHEN; LIAO; DUNSTAN, 2002).

A força do gel, que pode ser vista através de E' , é maior para a carragenana comercial como foi demonstrado anteriormente nas análises de teste de relaxação. O módulo elástico (E') aumenta com a concentração do biopolímero e varia conforme o tipo de carragenana utilizado ($\kappa \rightarrow \iota \rightarrow \lambda$ -) (DANIEL-DA-SILVA et al., 2008). Hilliou et al. (2006) sugerem que géis de carragenana híbrida κ/ι se assemelham estruturalmente a géis de κ -carragenana (analisados por MEUNIER; NICOLAI; DURAND, 1999).

A maior elasticidade (força) do gel na carragenana comercial pode ser explicada por sua menor quantidade de grupos sulfato (demonstrado na análise centesimal), os quais são a medida direta da quantidade de unidades não gelificantes no polissacarídeo. O aumento da elasticidade com a redução de grupos sulfato é amplamente documentado na literatura (NILSSON; PICULELL, 1991) para homopolímeros de κ - e ι -carragenana e é explicado pelo fato de que precursores biológicos sulfatados param a regularidade estereoquímica no local (o processo de gelificação é interrompido por monômeros não gelificantes) restringindo a transição conformacional do polissacarídeo de corda a hélices agregadas (HILLIOU et al., 2006).

5 CONCLUSÃO

Os parâmetros otimizados obtidos para extração nativa de carragenana da alga marinha *Kappaphycus alvarezzi*, cultivada em Florianópolis, SC, no sul do Brasil, foram de 4 horas e 74°C. Estes parâmetros otimizados de tempo e temperatura de extração foram obtidos através da Metodologia de Superfície de Resposta, considerando como respostas o rendimento (%), a força do gel (g. cm²) e a viscosidade (cP) da carragenana extraída. Na condição satisfatória de 74 °C e 4 h a extração da carragenana apresentou bom rendimento, melhores propriedades de gelificação e alta viscosidade. O tempo de extração não apresentou efeito sobre o rendimento e viscosidade. A variável independente temperatura de extração foi considerada mais importante em todas as respostas analisadas. Os modelos desenvolvidos e analisados estatisticamente demonstraram que são adequados para a otimização do processo de extração de carragenana de *K. alvarezii* pelo procedimento realizado.

A composição química da carragenana nativa foi semelhante à carragenana comercial. As amostras se diferenciaram apenas pela quantidade de alguns minerais, dentre eles o sódio, que está presente em maior quantidade na carragenana nativa (~3 g/100g). Entretanto, a relação sulfato/carboidrato se mostrou similar para as duas amostras. Foi encontrado alto teor de potássio em ambas carragenanas (~11 g/100g), sendo assim a carragenana comercial e a nativa podem ser consideradas como fonte de potássio quando inseridas na dieta.

Os espectros obtidos por FTIR mostraram a predominância de κ -carragenana, evidenciada pela presença da banda em 845 cm⁻¹, devido a presença de grupos sulfato no carbono 4 da galactose. Além disso, as análises relataram a ausência de precursores. A maior intensidade da absorbância a 1250 cm⁻¹ na carragenana extraída de *K. alvarezii* quando comparada com a carragenana comercial foi também observada e está de acordo com o conteúdo de sulfatos analisado por método turbidimétrico.

As análises realizadas por espectroscopia de RMN comprovaram a predominância de κ -carragenana na carragenana nativa, devido ao pico a 5,59 ppm referente ao hidrogênio ligado ao carbono 1 anomérico do resíduo de anidrogalactose, característico de amostras de κ -carragenana e presentes nas amostras de carragenana comercial e nativa.

A transição gel-sol das carragenanas avaliada por calorimetria exploratória diferencial ocorreu a 59,59 °C e 72,01 °C para a

carragenana comercial e nativa, respectivamente. No espalhamento de raios-X a baixos ângulos observou-se que com o aumento da temperatura ocorre uma queda da intensidade de espalhamento. A 50 °C ocorre uma queda brusca da intensidade de espalhamento. Nesta temperatura específica ocorre uma transição gel-sol. Já nos ensaios por DMTA se observou uma inflexão na curva de módulo elástico vs. temperatura, referente a transição sol-gel, para a amostra de carragenana comercial a uma temperatura de 41,90 °C, enquanto que esta mesma inflexão ocorreu para a amostra de carragenana nativa em 53,85 °C. Os resultados obtidos por DSC, SAXS e DMTA foram congruentes apresentando uma mesma faixa de temperatura de transição.

O valor encontrado para a massa molecular ponderal média (M_w) foi de aproximadamente 259.882 g/Mol e, portanto, a carragenana nativa mostrou-se segura do ponto de vista da massa molar sendo está acima do valor relacionado com danos à saúde. Porém, este valor encontrado foi menor quando comparado aos valores descritos na literatura e este fato refletiu nas propriedades obtidas pelo teste de relaxação.

O índice de polidispersidade encontrado por CPG para a carragenana nativa indicou a presença de cadeias com diferentes massas molares, sendo mais significativa a contribuição de cadeias com massa molecular pequena. A alta concentração de íons potássio (K^+) atuando como contra-íons dos grupos sulfato da carragenana reduz a repulsão eletrostática das cadeias poliméricas, tornando a estrutura mais enovelada e compacta, o que se traduz num fator- ρ próximo a 1, valor próximo daquele para uma esfera oca.

A extração de carragenana nativa realizada por meio da metodologia aplicada mostrou propriedades reológicas semelhantes as da carragenana comercial, como comprovado pelas análises de viscosidade e pelo teste de relaxação. A carragenana comercial e a nativa a 1,5 % (m/m) e 75 °C apresentaram comportamento Newtoniano e ambas foram consideradas sólidos viscoelásticos a 3 % (m/m) e 8 °C.

As propriedades da carragenana nativa extraída de *K. alvarezii*, cultivada na ilha de Florianópolis, através da metodologia utilizada se mostraram comparáveis as propriedades mostradas por carragenanas extraídas por outros métodos citados na literatura, o que indica o alto potencial desta metodologia limpa na extração deste ficocolóide, fornecendo benefícios potenciais para extração industrial, tanto do ponto de vista econômico como ambiental.

Outros estudos poderiam complementar este, como testes das aplicações desta carragenana nativa em alimentos e de suas propriedades sensoriais. Além de testes quanto sua alergenicidade e a utilização de seus possíveis compostos bioativos.

6 REFERÊNCIAS

ABU-JDAYIL, B. Modelling the time-dependent rheological behavior of semisolid foodstuffs. **Journal of Food Engineering**, v.57, p.97-102, 2003.

ANDERSON, N.S.; DOLAN, T.C.S.; REES, D.A. Carrageenans. Part VII. Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. The covalent structure of ι-carrageenan. **Journal of Chemical Society Perkin I**, p.2173-2176, 1973.

ARLTTOFT, D.; MADSEN, R.; IPSEN, R. Relating the microstructure of pectin and carrageenan in dairy desserts the rheological and sensory characteristics. **Food Hydrocolloids**, v.22, p. 660-673, 2008.

ASK, E.I.; AZANZA, R.V. Advances in cultivation technology of commercial eucheumatoid species: a review with suggestions for future research. **Aquaculture**, v.26, p.257-277, 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18th. Edition. Maryland, USA, 2005.

AZANZA-CORRALES, R.; SA-A, P. The farmed *Eucheuma* species (Gigartinales, Rhodophyta) in Danajon Reef, Philippines: carrageenan properties. **Hydrobiologia**, v.204/205, p.521-525, 1990.

BAEZA, R.I.; CARP, D.J.; PÉREZ, O.E.; PILOSOFF, A.M.R. κ-Carrageenan – Protein Interactions: Effect of Proteins on Polyssaccharide Gelling and Textural Properties. **Lebensm.-Wiss. µ-Technol.**, v.35, n.8, p.741-747, 2002.

BARAVIAN, C.; QUEMADA, D. Using instrumental inertia in controlled stress rheometry. **Rheological Acta**, v. 37, p.223-233, 1998.

BELLIDO, G. G.; HATCHER, D. W. Asian noodles: Revisiting Peleg's analysis for presenting stress relaxation data in soft solid foods. **Journal of Food Engineering**, v.92, p.29-36, 2009.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais – DSC. **Química Nova**, v.25, p.849-855, 2002.

BIXLER, H.J. Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. **Hydrobiologia**, v.326/327, p.35-37, 1996.

BIXLER, H.J.; JOHNDRO, K.; FALSHAW, R. Kappa-2 carrageenan: structure and performance of commercial extracts - II. Performance in two simulated dairy applications. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.619-630, 2001.

BODEAU-BELLION, C. Analysis of carrageenan structure. **Physiology Vegetal**, v.21, p.785-793, 1983.

BORGSTRÖM, J.; PICULELL, L.; VIEBKE, C.; TALMON, Y. On the structure of aggregated kappa-carrageenan helices. A study by cryo-TEM, optical rotation and viscometry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.18, p.223-229, 1996.

BORGSTRÖM, J.; EGERMAYER, M.; SPARRMAN, T.; QUIST, P.; PICULELL, L. Liquid crystallinity versus gelation of κ -carrageenan in mixed salts: effects of molecular weight, salt composition, e ionic strength. **Langmuir**, v.14, p.4935-4944, 1998.

BOURNE, M. C. **Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2002. 427p.
Disponível em: <http://books.google.com.br/books>. Acesso em 25 de novembro de 2009.

BRETAS, R.E.S.; D'AVILA, M.A. **Reologia de Polímeros Fundidos**. São Carlos: EdUFSCAR, 2000.196p.

BULBOA, C.R.; PAULA, E.J.; CHOW, F. Laboratory germination and sea out-planting of tetraspore progeny from *Kappaphycus striatum* (*Rhodophyta*) in subtropical waters of Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v.19, p.357-363, 2007.

CAMPO, V. L.; KAWANO, D.F.; SILVA, D.B.; CARVALHO, I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.167-180, 2009.

CAMPOS, S.D.S. **Reologia e textura em alimentos**. Campinas: ITAL, 1989.84p.

CANEVAROLO JR., S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004. 445p.

CARPON, I.; YVON, M.; MULLER, G. In-vitro gastric stability of carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v.10, n.2, p.239-244, 1996.

CHANDRA, R., SOBRAL, P. J. A. Calculation of viscoelastic properties of edible films: Application of the three models. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.20, p.250–256, 2000.

CHEN, Y.; LIAO, M-L.; DUNSTAN, D.E. The rheology of K⁺-κ-carrageenan as a weak gel. **Carbohydrate Polymers**, v.50, p. 109-116, 2002.

CIANCIA, M.; NOSEDA, M. D.; MATULEWICZ, M. C.; CEREZO, A. S. Alkali modification of carrageenans: Mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. **Carbohydrate Polymers**, v.20, p.95–98, 1993.

COHEN, S.M.; ITO, N. A critical review of the toxicological effects of carrageenan and processed Eucheuma seaweed on the gastrointestinal tract. **Critical Reviews in Toxicology**, v.32, p.413-444, 2002.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 279 p., 1990.

DANIEL-DA-SILVA, A.L.; LÓIO, R.; LOPES-DA-SILVA, J.A.; TRINDADE, T.; GOODFELLOW, B.J.; GIL, A.M. Effects of magnetite nanoparticles on the thermorheological properties of carrageenan hydrogels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.324, p.205-211, 2008.

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, p.389-395, 1997.

DORAISWAMY, D. The origins of rheology: a short historical excursion. **Rheology Bulletin**, v.71, p.7-17, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CEREZO, A.S. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. **Carbohydrate Research**, v.325, p.287-299, 2000.

ESTEVEZ, J.M.; CIANCIA, M.; CERESO, A.S. The system of galactans of the red seaweed, *kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. **Carbohydrate Research**, v.339, p.2575-2592, 2004.

FALSHAW, R.; BIXLER, H.J.; JOHNDRO, K. Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts I: Structure analysis. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.441-452, 2001.

FALSHAW, R.; BIXLER, H.J.; JOHNDRO, K. Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts. Part III: Structure analysis and performance in two dairy applications of extracts from the New Zealand red seaweed, *Gigartina atropurpurea*. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.129-139, 2003.

FISZMAN, S. M.; PONS, M.; DAMÁSIO, M. H. New parameters for instrumental texture profile analysis: instantaneous and retarded recoverable springiness. **Journal of Texture Studies**, v.29, p.499-508, 1998.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D.; AZAMAR, J.A. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. I. Effect of extraction conditions. **Botanica Marina**, v.49, p.65-71, 2006.

FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Nicaragua. **Journal of Applied Phycology**, v.20, p.537-541, 2008.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO J. B.; PRUDÊNCIO, E. S. The influence of Bifidobacterium BB-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v.96, p.621-627, 2010.

GERUNG, G.S.; OHNO, M. Growth rates of *Eucheuma denticulatum* (Burman) Collins et Harvey and *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty under different conditions in warm water of Southern Japan. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.413-415, 1997.

GÓES, H. G. Monitoramento da produção e do rendimento de carragenana da macroalga exótica *kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P.C. Silva e avaliação de técnicas de produção, em cultivo comercial na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. 69 p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro – RJ, 2009.

GUIBET, M.; KERVAREC, N.; GÉNICOT, S.; CHEVOLOT, Y.; HELBERT, W. Complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of *Gigartina skottsbergii* λ -carrageenan using carrabiose oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis. **Carbohydrate Research**, v.341, n.11, p.1859-1869, 2006.

GUIRY, M.D. Seaweed site. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, 2009. Disponível em: <http://www.seaweed.ie/>. Acesso em 28 de Janeiro de 2010.

HARRINGTON, J.C.; FOEGEDING, E.A.; MULVIHILL, D.M.; MORRIS, E.R. Segregative interactions and competitive binding of Ca^{2+} in gelling mixtures of whey protein isolate with Na^+ κ -carrageenan. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.468-489, 2009.

HAYASHI, L. Extração, teor e propriedades de carragenana de *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex P. Silva, em cultivo experimental em Ubatuba, SP. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Botânica). Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, 2001.

HAYASHI, L.; PAULA, E.J.; CHOW, F. Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of São Paulo State, Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v.19, p.393-399, 2007a.

HAYASHI, L.; OLIVEIRA, E.C.; BLEICHER-LHONNEUR, G.; BOULENGUER, P.; PEREIRA, R.T.L.; VON SECKEMDORFF, R.; SHIMODA, V.T.; LEFLAMAND, A.; VALLÉE, P.; CRITCHLEY, A.T. The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubatuba bay, São Paulo, Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v.19, p.505-511, 2007b.

HILLIOU, L.; LAROTONDA, F.D.S.; ABREU, P.; RAMOS, A.M.; SERENO, A.M.; GONÇALVES, M.P. Effect of extraction parameters on the chemical structure and gel properties of κ/ι - hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus*. **Biomolecular Engineering**, v.23, p.201-208, 2006.

HILLIOU, L.; GOLÇALVES, M.P. Gelling properties of a κ/ι hybrid carrageenan: effect of concentration and steady shear. **International Journal of Food Science and Technology**, v.42, p.678-685, 2007.

HOUSKA, M.; VALENTOVA, H.; STROHALM, J.; SESTAK, J.; POKORNY, J. Shear rates during oral and nonoral perception of viscosity of fluids foods. **Journal of Texture Studies**, v.29, p.603-615, 1998.

HUNG, L.D.; HORI, K.; NANG, H.Q.; KHA, T.; HOA, L.T. Seasonal changes in growth rate, carrageenan yield and lectin content in the red alga *Kappaphycus alvarezii* cultivated in Camranh Bay, Vietnam. **Journal of Applied Phycology**, v.21, p.265-272, 2009.

HURTADO, A.Q. Carrageenan properties and proximate composition of three morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* Doty (Gigartinales, Rhodophyta) grown at two depths. **Botanica Marina**, v.38, p.215-219, 1995.

IJIMA, M.; HATAKEYAMA, T.; TAKAHASHI, M.; HATAKEYAMA, H. Effect of thermal history on kappa-carrageenan

hydrogelation by differential scanning calorimetry. **Thermochimica Acta**, v.452, p.53-58, 2007.

IMESON, A. P. Carrageenan. In G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), **Handbook of Hydrocolloids** (pp. 87-102). Cambridge: Woodhead Publishing Ltda, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4.ed. São Paulo: IMESP, 2005. p.115-116.

JACKSON, S.G.; MC CANDLESS, E.L. Simple, rapid, turbidimetric determination of inorganic sulfate and/or protein. **Analytical Biochemistry**, v.90, p.802-808, 1978.

JI, S.; CORREDIG, M.; GOFF, H.D. Aggregation of casein micelles and κ -carrageenan in reconstituted skim milk. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.56-64, 2008.

KAMPF, N; NUSSINOVITCH, A. Rheological characterization of κ -carrageenan soy milk gels. **Food Hydrocolloids**, v.11, p.261-269, 1997.

KARA, S.; TAMERLER, C.; BERMEK, H.; PEKCAN, O. Hysteresis during sol-gel and gel-sol phase transitions of κ -carrageenan: a photon transmission study. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v.18, p.33-44, 2003.

KARA, S.; ARDA, E.; KAVZAK, B.; PERKAN, O. Phase transitions of κ -carrageenan gels in various types of salts. **Journal of Applied Polymer Science**, v.102, p.3008-3016, 2006.

KARLSSON, A.; SINGH, S.K. Acid hydrolysis of sulphated polysaccharides. Desulphation and the effect on molecular mass. **Carbohydrate Polymers**, v.38, p.7-15, 1999.

KNUTSEN, S. H.; MYSLABODSKI, D. E.; LARSEN, B.;USOV, A. I. A modified system of nomenclature for red algal galactans. **Botanica Marina**, v.37, p.163–169, 1994.

KNUTSEN, S.H.; SLETMOEN, M.; KRISTENSEN, T.; BARBEYRON, T.; KLOAREG, B.; POTIN, P. A rapid method for the separation and analysis of carrageenan oligosaccharides released by *iota*- and *kappa*-carrageenase. **Carbohydrate Research**, v.331, p.101-106, 2001.

LAHAYE, M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.173-184, 2001.

LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; LAUNAY, B.; MICHON, C.; PARKER, A.; DE KRUIF, C.G. Casein micelle/iota carrageenan interactions in milk: influence of temperature. **Food Hydrocolloids**, v.13, p.211-218, 1999.

LANGENDORFF, V.; CUVELIER, G.; MICHON, C.; LAUNAY, B.; PARKER, A.; DE KRUIF, C.G. Effects of carrageenan type on the behavior of carrageenan/milk mixtures. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.273-280, 2000.

LARA, S. H. **Tecnologia geral de aplicação de carragena**. Anais Simpósio sobre Hidrocolóides. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas – SP, p.22-48, 1991.

LAURINDO, J. B.; PELEG, M. Mechanical measurements in puffed rice cakes. **Journal of Texture Studies**, v.38, p.619-634, 2007.

LEE, Y. C.; ROSENAU, J. R.; PELEG, M. Rheological characterization of tofu. **Journal of Texture Studies**, v.14, p.143-154, 1983.

MACHADO, L.D.B.; MATOS, J.R.; Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: CANEVAROLO JUNIOR, S.V., (Ed.). **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. p.229-261.

MALAWISTAL, S.E.; CHEVANCE, A.B. Phagocytic Function of Human Blood Polymorphonuclear Leukocytes in the Presence of Carrageenan, a Potential Vaginal Microbicide. **Inflammation**, v.30, p.131-135, 2007.

MAMMARELLA, E. J.; PIANTE VICÍN, D. A.; RUBIOLO, A. C. Evaluation of stress-strain for characterization of the rheological behavior of alginate and carrageenan gels. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p.403-409, 2002.

MANGIONE, M. R.; GIACOMAZZA, D.; CAVALLARO, G.; BULONE, D.; MARTORANA, V.; SAN BIAGIO, P.L. Relation between structural and release properties in a polysaccharide gel system. **Biophysical Chemistry**, v.129, p.18-22, 2007.

MARCOTTE, M.; HOSHAHILI, A.R.T.; RAMASWAMY, H.S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, v.34, p.695-703, 2001.

MARTIN, A.H.; GOFF, H.D.; SMITH, A.; DALGLEISH, D.G. Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM). **Food Hydrocolloids**, v.20, p.817-824, 2006.

MENDOZA, W.G.; GANZON-FORTES, E.T.; VILLANUEVA, R.D.; ROMERO, J.B.; MONTAÑO, M.N.E. Tissue age as a factor affecting carrageenan quantity and quality in farmed *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva. **Botanica Marina**, v.49, p.57-64, 2006.

MEUNIER, V.; NICOLAI, T.; DURAND, D. Light scattering and viscoelasticity of aggregating and gelling κ -carrageenan. **Macromolecules**, v.32, p.2610-2616, 1999.

MICHEL, A-S.; MESTDAGH, M.M.; AXELOS, M.A.V. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.21, p.195-200, 1997.

MONTOLALU, R.I.; TASHIRO, Y.; MATSUKAWA, S.; OGAWA, H. Effects of extraction parameters on gel properties of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). **Journal of Applied Phycology**, v.20, p.525-526, 2008.

MÜLLER, C. M. O.; LAURINDO, J. B.; YAMASHITA, F. Effect of cellulose fibers on the crystallinity and mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v.77, p.293-299, 2009.

MUÑOZ, J. FREILE-PELEGRÍN, Y.; ROBLEDO, D. Mariculture of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatán, México. **Aquaculture**, v.239, p.161-177, 2004

MYSLABODSKI, D.E.; STANCIOFF, D.; HECKERT, R.A. Effect of acid hydrolysis on the molecular weight of kappa carrageenan by GPC-
IS. **Carbohydrate Polymers**, v.31, p.81-92, 1996.

NILSSON, S.; PICULELL, L. Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analyzed within the Poisson-Boltzmann cell model. 4. Effects of site-specific counterion binding. **Macromolecules**, v.24, n.13, p.3804-3811, 1991.

NORTON, B.I.T.; GOODALL, D.M.; MORRIS, E.R.; REES, D.A. Role of cations in the conformation of iota and kappa carrageenan. **Journal of Chemical Society**, v.79, p.2475-2488, 1983.

NÚÑEZ-SANTIAGO, M.C.; TECANTE, A. Rheological and calorimetric study of the sol-gel transition of κ -carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.763-773, 2007.

PAULA, E.J.; PEREIRA, R.T.L.; OHNO, M. Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. **Journal of Applied Phycology**, v.11, p.111-121, 1999.

PEKCAN, O.; TARI, O. Cation effect on gel-sol transition of kappa carrageenan. **Polymer Bulletin**, v.60, p.569-579, 2008.

PELEG, M. Considerations of a general rheological model for the mechanical behavior of viscoelastic solid food materials. **Journal of Texture Studies**, v.7, p.243-255, 1976.

PELEG, M. Contact and fracture elements as components of the rheological memory of solid foods. **Journal of Texture Studies**, v.8, p.36- 48, 1977.

PELEG, M. Characterization of the stress relaxation curves of solid foods. **Journal of Food Science**, v.44, p.277-281, 1979.

PELEG, M. Linearization of relaxation and creep curves of solid biological materials. **Journal of Rheology**, v.24, p.451-463, 1980.

PEREIRA, L.; SOUSA, A.; COELHO, H.; AMADO, A.M.; RIBEIRO-CLARO, P.J.A. Use of FTIR, FT-Raman and ^{13}C -NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. **Biomolecular Engineering**, v.20, p.223-228, 2003.

PEREIRA, L.; CRITCHLEY, A.T.; AMADO, A.M.; RIBEIRO-CLARO, P.J.A. A comparative analysis of phycocolloids produced by underutilized versus industrially utilized carrageenophytes (Gigartinales, Rhodophyta). **Journal off Applied Phycology**, v.21, p.599-605, 2009a.

PEREIRA, L.; AMADO, A.M.; CRITCHLEY, A.T.; VAN DE VELDE, F.; RIBEIRO-CLARO, P.J.A. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). **Food Hydrocolloids**, v.23, p.1903-1909, 2009b.

PICULELL, L.; NILSSON, S.; MUHRBECK, P. Effect of small amounts of kappa-carrageenan on the rheology of aqueous iota-carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v.18, p.199-208, 1992.

PICULELL, L.; VIEBKE, C.; LINSE, P. Adsorption of a flexible polymer onto a rigid rod. A model study. **Journal of Physical Chemistry**, v.99, p.17423-17430, 1995.

PICULELL, L.; BORGSTRÖM, J.; CHRONAKIS, I.S.; QUIST, P.-O.; VIEBKE, C. Organization and association of κ -carrageenan helices under different salt conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.21, p.141-153, 1997.

PRADO-FERNÁNDEZ, J.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, J.A.; TOJO, E.; ANDRADE, J.M.; Quantitation of κ -, ι -, and λ -carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. **Analytica Chimica Acta**, v.480, p.23-37, 2003.

RAO, V.N.M. Classification, description and measurement of viscoelastic properties of solid foods. In: RAO, M.A.; STEFFE, J.F. (Ed.) **Viscoelastic Properties of Solid foods**. London, New York: Elsevier Applied Science, Cap.1, p.3-47, 1992.

REIS, R.P.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; DOS SANTOS, C.P. Spatial and temporal variation of *Hypnea musciformis* carrageenan (Rhodophyta – Gigartinales) from natural beds in Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of Applied Phycology**, v.20, p.1-8, 2008.

RIDOUT, M.J.; GARZA, S.; BROWNSEY, G.J.; MORRIS, V.J. Mixed iota-kappa carrageenan gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.18, p.5-8, 1996.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M. Activity coefficients of counterions and conformation in kappa-carrageenan systems. **Biopolymers**, v.19, p. 1675-1687, 1980.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M. Calorimetric determination of the conformational transition of kappa carrageenan. **Carbohydrate Research**, v.105, n.2, p.227-236, 1982.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M.; VINCENDON, M. Spectroscopic characterization and conformation of oligo kappa carrageenans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.5, p.111–115, 1983.

ROCHAS, C.; LAHAYE, M.; YAPHE, W. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. **Botanica Marina**, v.29, p.335-340, 1986.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M.; LANDRY, S. Relation between the molecular structure and mechanical properties of carrageenan gels. **Carbohydrate Polymers**, v.10, p.115-127, 1989.

ROCHAS, C.; RINAUDO, M.; LANDRY, S. Role of molecular weight on the mechanical properties of kappa carrageenan gels. **Carbohydrate Polymers**, v.12, p.255-266, 1990.

SAITO, R.M.; OLIVEIRA, E.C. Chemical screening of Brazilian marine algae producing carrageenans. **Hydrobiologia**, v.204/205, p.585-588, 1990.

SCF, Opinion of the Scientific Committee on Food on Carrageenan, Opinion Expressed on 5 March 2003. European Commission Health and Consumer Protection Directorate_General , Brussels, Bélgica, 2003.

SCHARTL , WOLFGANG. **Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions**. Berlin: Springer, 2007.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006. 237p.

SILVA, F.; CABELLO, C.; PEREIRA, A.C.B. Adaptação da técnica de cromatografia de permeação em gel para determinar os tamanhos das moléculas dos biopolímeros de amidos. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v.1, p.1-8, 2005.

SLOOTMAEKERS, D.; VAN DIJK, J.A.P.P.; VARKEVISSER, F.A.; BLOYS VAN TRESLONG, C.J.; REYNAERS, H. Molecular characterization of κ - and ι -carrageenan by gel permeation chromatography, light scattering, sedimentation analysis and osmometry. **Biophysical Chemistry**, v.41, p.51-59, 1991.

SOUZA, M. S. Rendimento e qualidade de ficocolóides de cinco espécies de macroalgas com potencial econômico de Santa Catarina. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Aquicultura). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2009.

SPICHTIG, V.; AUSTIN, S. Determination of the low molecular weight fraction of food-grade carrageenans. **Journal of Chromatography B**, v.861, p.81-87, 2008.

STEFFE, J. F. Viscoelasticity, p. 294-348 In: **Rheological Methods in Food Processing Engineering**, Freeman Press, 1992.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**, (2nd ed.). East Lansing, MI: Freeman Press, 1996. 418p.

STOKES, J. R.; TELFORD, J. H. Measuring the yield behaviour of structured fluids. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v.124, p.137-146, 2004.

TABILO-MUNIZAGA, G.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Rheology for the food industry. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.147-156, 2005.

TARLO, S., DOLOVICH, J., LISTGARTEN, C. Anaphylaxis to carrageenan: A pseudo-latex allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, May, 1995.

THÀNH, T. T. T.; YUGUCHI, Y.; MINURA, M.; YASUNAGA, H.; TAKANO, R.; URAKAWA, H.; KAJIWA, K. Molecular characteristics and gelling properties of the carrageenan family, 1 – Preparation of novel carrageenans and their dilute solution properties. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v.3, p.15-23, 2002.

TOBACMAN, J.K.; WALLACE, R.B.; ZIMMERMAN, M.B. Consumption of carrageenan and other water-soluble polymers used as food additives and incidence of mammary carcinoma. **Medical Hypotheses**, v.56, p.589-598, 2001.

TOJO, E.; PRADO, J. Chemical composition of carrageenan blends determined by IR spectroscopy combined with a PLS multivariate calibration method. **Carbohydrate Research**, v.338, p.1309-1312, 2003.

TOMSIC, M.; PROSSNIGG, F.; GLATTER, O. A thermoreversible double gel: Characterization of a methylcellulose and κ -carrageenan mixed system in water by SAXS, DSC and rheology. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.332, p.41-50, 2008.

TRONO, G.C. Jr; LLUISMA, A.O. Differences in biomass production and carrageenan yields among four strains of farmed carrageenophytes in Northern Bohol, Philippines. **Hydrobiologia**, v.247, p.223-227, 1992.

TSUJI, R.F.; HOSHINO, K.; NORO, Y.; TSUJI, N.M.; KUROKAWA, T.; MASUDA, T.; AKIRA, S.; NOWAK, B. Suppression of allergic reaction by λ -carrageenan: Toll-like receptors 4/MyD88-dependent and -independent modulation of immunity. **Clinical and Experimental Allergy**, v.33, p.249-258, 2003.

UY, S.F.; EASTEAL, A.J.; FARID, M.M.; KEAM, R.B.; CONNER, G.T. Seaweed processing using industrial single-mode cavity microwave heating: a preliminary investigation. **Carbohydrate Research**, v.340, p.1357-1364, 2005.

VAN DE VELDE, F. et al. On the structure of κ/ι hybrid carrageenans. **Carbohydrate Research**, v.331, p.271-283, 2001.

VAN DE VELDE, F.; KNUTSEN, S. H.; USOV, A. I.; ROLLEMA, H. S.; CEREZO, A. S. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.73-92, 2002.

VAN DE VELDE, F.; ANTIPOVA, A.S.; ROLLEMA, H.S.; BUROVA, T.V.; GRINBERG, N.V.; PEREIRA, L.; GILSENAN, P.M.; TROMP, R.H.; RUDOLPH, B.; GRINBERG, V.Y. The structure of κ/ι -hybrid carrageenans II. Coil-helix transition as a function of chain composition. **Carbohydrate Research**, v.340, p.1113-1129, 2005.

VAN DE VELDE, F. Structure and function of hybrid carrageenans. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.727-734, 2008.

VIEBKE, C.; PICULELL, L.; NILSSON, S. On the mechanism of gelation of helix-forming biopolymers. **Macromolecules**, v.27, p.4160-4166, 1994.

VIEBKE, C.; WILLIAMS, P.A. Determination of molecular mass distribution of κ -carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fractionation. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.265-270, 2000.

VILLANUEVA, R.D.; MENDOZA, W.G.; RODRIGUEZA, M.R.C.; ROMERO, J.B.; MONTAÑO, M.N.E. Structure and functional performance of gartarinacean kappa-iota hybrid carrageenan and solieriacean kappa-iota carrageenan blends. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.283-292, 2004.

VILLANUEVA, R.D.; HILLIOU, L.; SOUSA-PINTO, I. Postharvest culture in the dark: an eco-friendly alternative to alkali treatment for enhancing the gel quality of κ / ι -hybrid carrageenan from *Chondrus crispus* (Gigartiales, Rhodophyta). **Biosource Technology**, v.100, p.2633-2638, 2009.

WANG, Q.; RADEMACHER, B.; SEDLMEYER, F. KULOZIK, U. Gelation behavior of aqueous solutions of different types of carrageenan investigated by low-intensity-ultrasound measurements and comparison to rheological measurements. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.6, p.465-472, 2005.

WILKINSON, C.; DIJKSTERHUIS, G.B.; MINEKUS, M. From food structure to texture. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.442-450, 2000.

WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Introduction to food hydrocolloids. In G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), **Handbook of Hydrocolloids** (pp. 87-102). Cambridge: Woodhead Publishing Ltda, 2000.

YUGUCHI, Y. Nano-structure analysis of sugar chains by small angle X-ray scattering. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**, v.21, p.1-12, 2009.

ZHOU, G.; SHENG, W.; YAO, W.; WANG, C. Effect of low molecular λ -carrageenan from *Chondrus ocellatus* on antitumor H-22 activity of 5-Fu. **Pharmacological Research**, v.53, p.129-134, 2006.

ZÚÑIGA, E. A.; MATSUHIRO, B.; MEJÍAS, E. Preparation of a low-molecular weight fraction by free radical depolymerization of the sulfated galactan from *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta) and its anticoagulant activity. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.208-215, 2006.